Arbeiten aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut
der Universität Göttingen

Beiträge zur Kenntnis der Physiologie und Verbreitung denitrifizierender Thiosulfat-Bakterien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Philosophischen Fakultät der Georg August-Universität

zu Göttingen

vorgelegt von

Alfred Gehring

aus Hameln

Göttingen
Verlag von Gustav Fischer in Jena
1914

Arbeiten aus dem landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut
der Universität Göttingen

Beiträge zur Kenntnis der Physiologie und Verbreitung denitrifizierender Thiosulfat-Bakterien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Philosophischen Fakultät der Georg August-Universität

zu Göttingen

vorgelegt von

Alfred Gehring

aus Hameln

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Göttingen
Verlag von Gustav Fischer in Jena
1914

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 1914

Referent: Herr Professor Dr. A. Koch

Sonderabdruck aus dem Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. II. Abteilung. Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin, Verlag von Gustav Fischer in Jena. 42. Band. 1914. Nr. 15/16.

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

Inhalt.

Seite

I. Besprechung der über Thiosulfatbakterien, besonders denitrifizierender Formen, erschienenen Literatur 1

II. Untersuchung der von Lieske behandelten autotrophen, anaëroben Bakterienform in Nährlösungen 4

Kapitel I. Reinkultur dieser Form aus Schlamm 4
II. Reinkultur dieser Form aus Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf 6
III. Verbreitung dieser Bakterien in verschiedenen Tiefen von Ackererde und Torf 7
IV. Untersuchung über die Zahl der autotrophen, anaëroben Thiosulfatbakterien in Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf 8
V. Unterscheidung von Rassen dieser Bakterienform in den verschiedenen Bodenarten 9
VI. Umsetzungen dieser Bakterienart bei steigendem Thiosulfatgehalt der Nährlösung 10
VII. Ersatz des Nitrates durch andere Sauerstoffquellen 12
VIII. Andere Energie- und Kohlenstoffquellen 13

III. Umsetzungen denitrifizierender Thiosulfatbakterien im Boden 15

Kapitel I. Verhältnis anderer denitrifizierender Bakterien zu Thiosulfat und Nachweis und Verlauf von Nitratzersetzungen im Boden durch Thiosulfat als Energiematerial 16
II. Weitere Untersuchungen über Zahl und Rassen der Thiosulfatbakterien in den verschiedenen Böden 19
III. Nitratumsetzung bei Änderung des Thiosulfat- und Nitratgehaltes 20
IV. Einfluß des Wassergehaltes auf die Nitratzersetzung 22
V. Nitratzersetzung bei Änderung der Energie-, Nitrat- und Karbonatquellen 24

IV. Besprechung der Thalauschen Arbeit über: Die Einwirkung von im Boden befindlichen Sulfiten, von Thiosulfat und Schwefel auf das Wachstum von Pflanzen 26

Kapitel I. Die Thalauschen Versuchsresultate 26
II. Widerlegung der Thalauschen Erklärungen und Schlüsse aus Tatsachen seiner Arbeit 29
III. Erklärung der Thalauschen Versuchsergebnisse durch die Resultate der vorliegenden Arbeit 31

V. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse . . . 34

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548101_0013

I.

Schon seit geraumer Zeit war es bekannt, daß der Schwefel und seine Verbindungen von Bakterien dazu benutzt werden können, als Energiematerial für den Lebensprozeß zu dienen, daß also der Schwefel in dieser Hinsicht die organischen Kohlenstoffverbindungen ersetzen und den Organismen eine autotrophe Lebensführung ermöglichen kann. Vor allem war es der Schwefelwasserstoff, der ja durch seinen Geruch schon stark auffällt, und der Schwefel, die in dieser Hinsicht untersucht waren.

Bei seinen Untersuchungen über Beggiatoa gelang es Nathansohn[1]) im Jahre 1902 eine neue autotrophe Bakteriengruppe aufzufinden, die als Energiematerial Thiosulfat verwendet, und die sich von anderen Schwefelbakterien noch dadurch unterscheidet, daß bei ihr keine intrazelluläre Schwefelabscheidung erfolgt, sondern nur eine extrazelluläre Niederschlagung des Schwefels stattfindet. Das Thiosulfat wird oxydiert zu Sulfat, und durch den hierbei auftretenden Energiegewinn wird den Bakterien eine autotrophe Lebensführung ermöglicht. Thiosulfate entstehen in der Natur bei der freiwilligen Oxydation von Schwefelwasserstoff und von Sulfiden[2]), jedoch stellte sich bei späteren Versuchen heraus[3]), daß auch andere Schwefelverbindungen von diesen Bakterien oxydiert werden können, z. B. H_2S. Nun ermöglicht aber gerade das Thiosulfat bei seiner leichten Wandelbarkeit möglichst schnelle und beträchtliche Umsetzungen. Da außerdem das Natriumthiosulfat sehr leicht rein zu beschaffen ist und so eine einfache und glatte Verwendung zuläßt, da vor allen Dingen auch die ersten Formen dieser Bakteriengruppe in Nährlösungen mit Thiosulfat als Energiematerial nachgewiesen wurden, so erhielt diese Gruppe den Namen der „Thiosulfatbakterien“ oder nach Omelianski[4]) „Thionsäurebakterien“.

Die ersten Formen dieser Art wurden von Nathansohn im Meeresschlamm nachgewiesen. Sie zeichneten sich durch lebhafte Beweglichkeit aus und oxydierten das Thiosulfat zu Sulfat und Tetrathionsäure. Durch Zusatz von Traubenzucker und anderen Kohlehydraten zur Nährlösung wurde zwar ihre Entwicklung nicht gehemmt, doch zeigte sich dadurch auch keine Steigerung ihrer Lebenstätigkeit. Sie gediehen gleich gut, wenn man ihnen als Kohlenstoffquelle nur die Kohlensäure der Luft oder irgendein Karbonat zur Verfügung stellte. So folgerte Nathansohn, daß man „zum min-

[1]) Nathansohn, Mitt. d. zool. Stat. Neapel. Bd. 15. 1902. p. 655 (Ref. Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. p. 109).

[2]) Löhnis, Handb. d. landw. Bakt. 1910. p. 709.

[3]) Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. p. 594.

[4]) Omelianski, Lafars Handb. d. techn. Mykol. Bd. 3. 1904/06. p. 239.

desten mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen darf, daß diesen Bakterien die Fähigkeit, organische Substanzen in einer physiologisch irgendwie in Betracht kommenden Weise zu oxydieren, fehlt, und daß in der Tat hier eine anorganische Verbindung, das Thiosulfat, völlig die Rolle vertritt, die sonst den Kohlenstoffverbindungen im Atmungsstoffwechsel zukommt."

So zeigte sich deutlich, „daß der Schwefel eine wichtige Rolle im Kreislauf der Natur zu erfüllen hat; denn es ist klar, daß dieses Element in seinen verschiedenen Verbindungsformen in den dunklen Tiefen des Meeres und der süßen Gewässer immerfort tätig ist bei der Neuschaffung von organischer Substanz"[1]).

Diese Hauptergebnisse der Nathansohnschen Arbeit stützen sich auf sehr sorgfältige Versuche, die noch etwas näher besprochen werden sollen. Zunächst die Schwefelumsetzungen.

Als Energiequelle wurde in allen Versuchen das Natriumthiosulfat benutzt. Dies ist nun im allgemeinen ein leicht zersetzlicher Körper. Es zeigte sich aber, daß durch das Sterilisieren der Nährlösung und durch längere Einwirkung von Licht innerhalb von drei Wochen keine Zersetzung des Thiosulfats eintrat; jedenfalls konnte keine Schwefelausscheidung beobachtet werden.

Bei der genauen quantitativen Festlegung des Schwefelumsatzes traf Nathansohn auf Schwierigkeiten: Die verbrauchte Thiosulfatmenge entsprach nicht der gebildeten Sulfatmenge. Diese Unterschiede ließen sich im Verlaufe der Arbeit aufklären, indem festgestellt wurde, daß neben Sulfat auch noch Polythionsäuren als Oxydationsprodukte auftraten. Aus den Analysenresultaten ging sodann noch hervor, daß die gebildeten Polythionsäuren aus Tetrathionsäure bestehen, und daß der gesamte Schwefelumsatz nach folgender Gleichung verläuft:

$$3\ Na_2S_2O_3 + 5\ O = S_2 \begin{matrix} SO_3Na \\ SO_3Na \end{matrix} + 2\ SO_4Na_2.$$

Die von den Bakterien getrennte Kulturflüssigkeit besitzt oxydierende Eigenschaften, wie von Nathansohn festgestellt wurde. Und zuerst war er geneigt, mit dieser Oxydationswirkung die extrazelluläre Schwefelausscheidung zu erklären. Diese Annahme fand er jedoch nicht ganz bestätigt. Vielmehr gelang es ihm, die Schwefelausscheidung durch eine Reaktion der Tetrathionsäure mit dem Natriumthiosulfat zu erklären, über die er jedoch in der Literatur sich keinen Aufschluß verschaffen konnte. Versetzte er eine schwache Lösung von tetrathionsaurem Natrium mit Natriumthiosulfat, so trat je nach der Konzentriation rascher oder langsamer ein Schwefelniederschlag auf.

Über den Kohlenstoffumsatz konnte Nathansohn feststellen, daß diese Bakterien die Fähigkeit haben, anorganische Kohlensäure zu reduzieren und deren Kohlenstoff zum Aufbau von organischer Substanz zu benutzen. Kulturen mit organischer Substanz ohne den geringsten Kohlensäuregehalt ergaben nicht das geringste Wachstum. Dagegen ließ sich zeigen, daß bei Ausschluß von organischer Substanz bei alleiniger Gegenwart von $MgCO_3$ oder der Kohlensäure der Luft Wachstum eintrat. Bei der Verwendung der Kohlensäure der Luft war das Wachstum allerdings schwächer als bei Zusatz von $MgCO_3$; aber diese Tatsache läßt sich vielleicht so erklären, daß durch den Zusatz von $MgCO_3$ für die Nährlösung eine günstigere Alkaleszenz erreicht wurde.

---

[1]) Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. p. 594.

Bei seinen Untersuchungen über autotrophe Organismen griff Beijerinck[1]) auch auf diese Nathansohnschen Thiosulfatbakterien zurück. Er stellte z. B. fest, daß außer Thiosulfat auch andere Schwefelverbindungen wie Schwefelwasserstoff, Tetrathionat usw. diesen Bakterien als Energiematerial dienen können. Vor allen Dingen gelang es ihm aber, „die Reduktion der Kohlensäure durch Denitrifikation mit Thiosulfat oder freiem Schwefel als Energiequellen festzustellen". Die energetischen Verhältnisse dieses Lebensprozesses kommen in folgender Gleichung zum Ausdruck:

$$6\,KNO_3 + 5\,S + 2\,CaCO_3 = 3\,K_2SO_4 + 2\,CaSO_4 + 2\,CO_2 + 3\,N_2 + 659{,}5\ \text{Kal.}$$

Der Energiegewinn ist also ziemlich bedeutend. Beijerinck gab dieser Bakterienform den Namen Thiobacillus denitrificans; eine weitere Durcharbeitung dieser Form erfolgte aber nicht.

An dieses Tatsachenmaterial schließen sich in neuerer Zeit Untersuchungen von Lieske[2]) an, und zwar beschäftigte er sich mit der Kultur anaërober, denitrifizierender Thiosulfatbakterien, von denen er vermutet, daß sie mit Thiobacillus denitrificans identisch sind. In hohen Standzylindern erhielt er nach einigen Tagen in geeigneter, mit Schlamm beimpfter Nährlösung verschiedene scharf abgegrenzte Platten oder Zonen von Schwefelbakterien, die sich an den Stellen entwickeln, wo sie die passendsten Lebensbedingungen in bezug auf Sauerstoffnahrung finden. Von diesen Formen wählte Lieske diejenige, die sich am weitesten von der Flüssigkeitsoberfläche entfernt absetzte und die dadurch ein sehr geringes Sauerstoffbedürfnis anzeigte.

Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang es Lieske, von diesen Formen Reinkulturen herzustellen. Der Form nach waren es „kleine, dünne Stäbchen von ungefähr 1 μ Länge. Mit Säurefuchsin und Methylenblau waren sie leicht färbbar. Eine Sporenbildung konnte nicht beobachtet werden." Als sicher konnte festgestellt werden, daß es sich um kohlenstoffautotrophe Formen handelte, auf die ein Zusatz von organischer Substanz aber nicht giftig einwirkte. Als Energiequelle konnten sie außer Thiosulfat auch noch freien Schwefel, Schwefelwasserstoff und unterschwefelsaures Natrium ($Na_2S_2O_6$) verwenden. Alle Schwefelverbindungen wurden zu Sulfat oxydiert. Und zwar entstand das Sulfat nicht unmittelbar, sondern es wurden von den Bakterien alle Oxydationsstufen des Schwefels gebildet und umgesetzt, so daß sie also nicht nur als an eine Schwefelquelle allein angepaßt erschienen, sondern scheinbar den Schwefel in der Gesamtheit seiner Verbindungen zu Sulfat umsetzen können.

Diese hier beschriebene Bakterienform wurde nur im Schlamm des Teiches im Leipziger Botanischen Garten nachgewiesen. Es wurde vermutet, daß sie auch wohl in dem Schlamm des Teiches im Botanischen Garten von Freiburg vorhanden sind, doch wurde dies letzte Vorkommen nicht genauer nachgeprüft. Wie aus der verschiedenen Höhe der Bakterienniveaus hervorgeht, gibt es alle Übergänge von anaëroben zu vollkommen aëroben Organismen dieser Bakteriengruppe. Die Untersuchungen von Lieske wurden aber nur mit einer Art — der extremst anaëroben — durchgeführt. Es gibt nach diesem Forscher „sicher eine große Anzahl von Arten, die einen ähnlichen, vielleicht in den Einzelheiten etwas abweichenden Stoffwechsel besitzen, und es ist daher er-

[1]) Beijerinck, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. p. 594.
[2]) Lieske, Ber. d. deutschen botan. Gesellsch. Bd. 30. 1912.

wünscht, daß durch neue Untersuchungen unsere Kenntnis über diese, für den Haushalt der Natur bedeutungsvolle Gruppe von Bakterien erweitert wird".

Diese Kenntnisse zu fördern und vor allen Dingen die Verbreitung dieser Bakterien genauer festzustellen und ihre Physiologie näher zu untersuchen, war der Zweck der vorliegenden Arbeit.

II.

Kapitel I.

Reinkultur der Lieskeschen Form aus Schlamm.

Zunächst handelte es sich darum, diese von Lieske beschriebene Form in ihrer Verbreitung festzustellen. Als Nährlösung für alle Versuche dieser Arbeit wurde die von Lieske angegebene benutzt:

H_2O dest.	100 ccm
$Na_2S_2O_3$	0,5 g
KNO_3	0,5 g
$NaHCO_3$	0,1 g
K_2HPO_4	0,02 g
$MgCl_2$	0,01 g
$CaCl_2$	Spur
Fe_2Cl_6	„

Diese Nährlösung wurde in 45 cm hohe Reagenzröhrchen gefüllt und mit Schlamm geimpft. Die Schlammproben waren teilweise aus der Umgegend von Göttingen, aus dem Teich des Botanischen Gartens zu Göttingen, sowie aus der Umgebung meiner Vaterstadt Hameln. In all diesen Kulturen trat lebhafte Gasbildung auf. Im Gegensatz zu Lieske trat hierbei nur ein einziges Mal — und dann nur in sehr undeutlicher Ausbildung — eine Bakterienplatte auf. Worin dieser Unterschied begründet liegt, ob er vielleicht veranlaßt wird durch die Weite der benutzten Röhrchen, in denen häufig ein Aufsteigen von Gasblasen zu beobachten war, welches doch selbstverständlich die Plattenbildung störte, kann ich nicht entscheiden. Diese eine beobachtete Bakterienplatte lag etwa 40 cm unter der Flüssigkeitsoberfläche, und aus dieser Tiefe wurde dann bei den späteren Versuchen immer mittels einer Kapillare abgeimpft. Auch machte sich zwischen der von Lieske beschriebenen Bakterienform und der hier gefundenen eine Differenz bemerkbar in der Zeit, die bis zum Auftreten der Gasbildung verging. Es war bei den hiesigen Formen eine erheblich längere Zeit bis zum Auftreten der Gasbildung nötig. Dieser Unterschied soll aber im Zusammenhang mit anderen Tatsachen weiter unten besprochen werden.

Sonst stimmten aber die Bakterien in allen Kulturen mit denen von Lieske der Form und Größe nach sehr gut überein. Es waren ebenfalls Stäbchen von ungefähr 1 μ Länge, die sich mit Methylenblau sehr gut färben ließen und bei denen außerdem auch niemals eine Sporenbildung zu beobachten war.

Von diesen Kulturen wurde abgeimpft in 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen, die unter Quecksilberverschluß standen, ähnlich wie bei Gärverschlüssen. Die Kolben wurden mit einem durchlöcherten Stopfen versehen; durch das Loch des Korkes führte ein gebogenes Glasrohr, welches unter Quecksilber mündete. Das Glasrohr wurde ebenfalls mit Nährlösung gefüllt, so daß die ganze Kultur gänzlich vom Sauerstoff abgeschlossen war. Zur

Sicherheit wurden die Korkstopfen noch regelmäßig durch einen Paraffinüberzug abgedichtet.

In diesen Kulturen trat ebenfalls nach einigen Tagen — übrigens wieder mit dem Unterschied in der Zeitdauer der Gasbildung, wie er schon erwähnt wurde, Gasbildung auf. Auch hier setzten sich, wie bei Lieske, feine Bakterienhäutchen an den Boden und an der Wandung des Kolbens ab, so daß die Flüssigkeit bei flüchtigem Anblick wie getrübt aussah. An diesen Kulturen wurde festgestellt, daß Thiosulfat verschwand (durch Titration mit Jod nach der auf Seite 417 beschriebenen Methode nachgewiesen), daß Sulfat gebildet wurde (durch Fällung des Sulfates als $BaSO_4$ nachgewiesen), daß Nitrat verbraucht wurde und daß die Bakterien mit Natriumbikarbonat als Kohlenstoffquelle auskamen, also kohlenstoffautotroph waren, wie Lieske angegeben hatte. Der Nitratverbrauch wurde quantitativ festgestellt und zwar mit Hilfe der Reduktion mit Zink und Eisen in alkalischer Lösung. Am Anfange des III. Teiles dieser Arbeit wird diese Art der Nitratbestimmung genauer mitgeteilt.

Daß das Thiosulfat wirklich durch Bakterientätigkeit zu Sulfat oxydiert wurde, hatte schon Nathansohn gezeigt. Durch Sterilisieren und längeres Stehen an der Luft veränderte sich der Thiosulfatgehalt der Lösung niemals. Auch von mir wurde diese Tatsache nachgeprüft. Aber auch hier konnte das gleiche Verhalten festgestellt werden. Das Thiosulfat zersetzte sich nicht beim Sterilisieren, auch nicht bei Zusatz von Nitrat, Karbonat und Bikarbonat. Das Bestimmen des Thiosulfates erfolgte in der bekannten Weise durch Titrieren mit einer Jodlösung. In dieser Arbeit wurde stets zur Erreichung einer größeren Genauigkeit mit einer 1 : 100 n-Jodlösung gearbeitet.

Dazu wurden von den auftretenden Gasen Analysen gemacht. Allerdings wurde nur das von Rohkulturen gebildete Gas analysiert. Zu den Versuchen wurde ein Gefäß benutzt, welches aus einem weiten Rohr bestand, das oben in eine Kapillare ausgezogen war. Seitlich war ein Steigrohr mit einer größeren Kugel angeschmolzen. Nach dem Sterilisieren des Gefäßes wurde die Flüssigkeit durch die Kapillare geimpft; darauf wurde diese Öffnung zugeschmolzen, wobei gleichzeitig darauf geachtet wurde, daß nur ein ganz kleines Luftbläschen über der Flüssigkeit zurückblieb. Die Flüssigkeitsoberfläche in der Kugel, welche die bei der Gasbildung verdrängte Flüssigkeit aufnehmen sollte, wurde durch darauf geschichtetes sterilisiertes Paraffin von der Luft abgeschlossen. Nach Beendigung der Gasbildung wurde das Gefäß durch einen Gummischlauch mit dem Hempelschen Apparat für Gasanalysen verbunden. Im Schlauch wurde sodann die Spitze der Kapillare abgebrochen, und das Gas konnte dann in die Bürette des Hempelschen Apparates übertreten.

Bei der Untersuchung des Gases ergab sich, daß nur wenige Prozente aus Kohlensäure bestanden, daß alles übrige reiner Stickstoff war. Sauerstoff ließ sich nicht nachweisen:

Kohlensäure 5,5 %
Stickstoff 94,5 %

Allerdings weichen diese Werte von den durch Lieske gefundenen ab, der folgende Prozentgehalte angibt:

Kohlensäure ungefähr 20 %
Stickstoff ungefähr 80 %.

Doch muß man bedenken, daß es sich hier um eine Rohkultur handelt, die allerdings durch 10- bis 12-maliges Überimpfen fast vollständig frei von

anderen Bakterien geworden war. Eine Reinkultur war es aber doch auf keinen Fall.

Lieske war die Reinkultur seiner Bakterienform nach mannigfachen Fehlschlägen „schließlich gelungen durch Aufstreichen der Bakterienhaut auf Agarplatten, die mit der angegebenen Nährlösung und 1,5-proz. gewässertem Agar hergestellt waren. Die Bakterien kamen aber nur dann zur Entwicklung, wenn die Platten sich in einer Atmosphäre von sehr geringem Sauerstoffdruck befanden. Die Bakterienkolonien waren im Agar als schwach opalisierende Stellen zu erkennen."

Auf genau die gleiche Weise wurden auch hier die Reinkulturen erhalten. Der Sauerstoffabschluß wurde erreicht, indem die Petrischalen in eine Wasserstoffatmosphäre gebracht wurden. Der Wasserstoff wurde vorher durch Durchleiten durch Kaliumpermanganatlösung und Schwefelsäure gereinigt. Nach 5 bis 6 Tagen zeigten sich die Kolonien als gelbliche, opalisierende Pünktchen. Daß wirklich sehr streng anaërobe Formen vorlagen, ergibt sich daraus, daß trotz des Abschlusses des Sauerstoffes durch eine mehrere Zentimeter hohe Paraffinschicht kein Wachstum eintrat, wo doch z. B. Fred[1]) bei seinen Versuchen in unserem Institute gezeigt hatte, daß ein solcher Verschluß genügte, um die Leukoverbindung von Methylenblau farblos zu erhalten.

Überblickt man diese Ergebnisse, so darf man mit Sicherheit annehmen, daß die hier vorliegende Bakterienform identisch ist mit der von Lieske benutzten. Damit ist aber auch gleichzeitig die Vermutung von Lieske als richtig nachgewiesen, daß dieser Bakterienart im Schlamm eine ganz allgemeine Verbreitung zukommt, und daß ihren Umsetzungen im Kreislauf des Schwefels wirklich die Bedeutung zukommt, die schon Lieske annahm.

Kapitel II.

Reinkultur der Lieskeschen Form aus Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf.

Nach der Feststellung dieser Tatsache wurde daran gegangen, diese Bakterienform auch an anderen Standorten nachzuweisen. Es wurden wiederum Anreicherungskulturen angesetzt mit 45 cm langen Reagenzröhren, die mit folgenden Substanzen geimpft wurden: Ackererde und Komposterde aus Göttingen, Erde aus den Buchenwaldungen der Göttinger Umgebung und Hochmoortorf aus Ostfriesland. In allen Kulturen trat nach geraumer Zeit eine Trübung und Gasbildung ein. Auch hier wurde mit einer Kapillare aus 40 cm Tiefe übergeimpft in Erlenmeyer-Kolben, die unter Quecksilberverschluß standen. Hier trat nach einiger Zeit ebenfalls Gasbildung ein, die Bakterien setzten sich in einem Häutchen sowohl auf den Boden, wie auch den Wandungen des Gefäßes ab. Bei mikroskopischer Beobachtung zeigten die vorhandenen Bakterien fast in Reinkultur dieselben Größenverhältnisse, das gleiche Färbevermögen, wie die aus Schlamm isolierte Bakterienform. Ebenfalls war auch hier keine Sporenbildung zu beobachten.

Sodann gelang es auch hier nach der von Lieske gegebenen Vorschrift, Reinkulturen von den Formen sämtlicher benutzten Bodenarten herzustellen; die Kolonien traten als kleine gelbliche, opalisierende Pünktchen auf dem Agar auf. Auch diese Formen wuchsen nicht unter Abschluß

[1]) Fred, E. B., Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 421.

mit Paraffin, so daß auch sie streng anaërob sind. Allerdings wurden Reinkulturen in Nährlösung von Kompost und Erde nur vereinzelt erhalten. Die Kulturen wuchsen außerordentlich schlecht an. Aber die Tatsache, daß überhaupt wirkliche Reinkulturen einige Male erhalten wurden, genügt ja auch. Ferner konnten alle Bakterienformen in Nährlösungen gezogen werden, die nur anorganische Kohlenstoffquellen enthielten. Somit waren auch diese Formen kohlenstoffautotroph. Selbstverständlich wurde das Thiosulfat zu Sulfat oxydiert und Nitrat verbraucht, wie an mehreren Versuchen quantitativ nachgewiesen wurde.

Aus all diesen vorliegenden Tatsachen wurde der Schluß gezogen, daß auch die Bakterienformen dieser verschiedenen Impfmaterialien identisch sind mit derjenigen Bakterienart, die Lieske zu seinen Untersuchungen benutzte. Somit war festgestellt, daß dieser Bakterienform eine ungeahnte Verbreitung zukommt, und daß sie von außerordentlicher Bedeutung ist sowohl für den Umsatz des Schwefels, wie auch der organischen Substanz in der Natur. Denn der bei jeder Fäulnis auftretende Schwefelwasserstoff wird durch diese Bakterien als Sulfat im Boden festgelegt und wird so dem Kreislauf erhalten. Aus dem Sulfat kann dann der Schwefel durch andere Bakterienformen zu Schwefelwasserstoff reduziert oder zum Aufbau von Eiweiß benutzt werden. Ebenfalls wird die durch die Lebensvorgänge entstehende Kohlensäure von diesen Thiosulfatbakterien wieder in den Kreislauf des Kohlenstoffs in der Natur hineingezogen, reduziert und zum Aufbau von organischer Substanz verwendet. Somit erfüllen diese Bakterien eine außerordentlich wichtige Funktion, und ihre allgemeine Verbreitung ist daher von sehr großer Bedeutung.

Kapitel III.

Verbreitung dieser Bakterien in verschiedenen Tiefen von Ackererde und Torf.

Speziell für Ackererde und Torf wurde die Verbreitung dieser Bakterien in den verschiedenen Tiefen des Bodens untersucht. Diese Untersuchungen wurden derartig angestellt, daß gleiche Mengen von Nährlösung mit einer gleichen Menge (es wurde stets die gleiche Platinöse benutzt) von Impfmaterial versetzt wurden, und daß dann beobachtet wurde, wann die erste Gasbildung auftrat. Von ungedüngter Ackererde wurden Proben von der Oberfläche, aus 20 cm und 25 cm Tiefe genommen. Bei allen drei Kulturen trat am siebenten Tage eine gleich starke Gasbildung ein, so daß dieser Boden in den verschiedenen Tiefen eine gleiche Anzahl dieser Thiosulfatbakterien enthält.

Ganz ähnlich wurde es mit Torf aus 5 cm, 40 cm und 50 cm Tiefe gemacht. Auch hier ergab sich nach zwei Tagen, daß in allen drei Kulturen eine gleich starke Gasbildung eingetreten war. Somit war auch im Torf in den verschiedenen Tiefen der Gehalt an Thiosulfatbakterien gleich.

Da hier doch ganz streng anaërobe Formen untersucht wurden, so kann man sich diese Tatsache nur dadurch erklären, daß eben durch das Zusammenleben aërober und anaërober Bakterien solche Bedingungen geschaffen werden, die selbst den strengst anaëroben Formen Leben und Wachstum an der Oberfläche des Bodens ermöglichen, indem durch die aëroben Formen sofort aller auftretender Sauerstoff verbraucht wird.

Die Tatsache, daß im Torf Denitrifikationsbakterien auftreten, frappiert anfänglich, wenn man Angaben findet, daß im Torf überhaupt kein

Nitrat vorhanden sein soll. Z. B. gibt Ritter[1]) an, daß er in einer überaus großen Anzahl von Hochmoorproben niemals auch nur die geringste Spur von Nitrat gefunden hat. Dagegen kann festgestellt werden, daß in dem Torf, mit dem diese Untersuchungen angestellt wurden — es war vollkommen unzersetzter und unberührter Torf aus etwa 20 cm Tiefe aus der Gegend von Leer in Ostfriesland — daß in diesem Torf jedenfalls Nitrat in einer verhältnismäßig großen Menge vorhanden war, wenn auf Trockensubstanz umgerechnet wurde. Den genauen Wert der Nitratmenge möchte ich nicht angeben, weil die Übereinstimmung der Kontrollbestimmungen nicht sehr gut war. Daß auch wirklich eine Nitratbildung im Hochmoor stattfinden kann, wurde durch folgende Untersuchung bestätigt: Es fanden sich in unbehandeltem Hochmoortorf derselben Sorte nach achtwöchigem Stehen 3,3 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockenem Torf, während sich im Torf, der mit Ammoniumsulfat versetzt war, pro 100 g Trockensubstanz 7,8 mg Nitratstickstoff fanden. Es ergab sich also ein Mehr von 4,5 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockenem Torf. Somit war in dem vorliegenden Torf die Bedingung gegeben, die denitrifizierenden Thiosulfatbakterien ein lebhaftes Wachstum ermöglichen.

Kapitel IV.

Untersuchungen über die Zahl der Lieske schen Bakterien in Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf.

Bei diesen Untersuchungen ergaben sich noch gewisse Aufschlüsse über die Physiologie dieser Bakterien, die teils mit den von Lieske gemachten Erfahrungen übereinstimmten, teils ganz neu waren.

Wie schon Lieske angegeben hatte, handelte es sich bei der vorliegenden Bakterienart um äußerst empfindliche Organismen. Ohne irgendeinen ersichtlichen Grund, bei nach jeder Hinsicht gleichen Bedingungen wurden ihre Umsetzungen auf einmal geringer, starben meine Kulturen ab, oder es erfolgte überhaupt kein Anwachsen mehr. Eine Erklärung für diese Tatsachen konnte ich ebensowenig wie Lieske finden. Man kann sich nur denken, daß diese Bakterien, deren ganze energetische Verhältnisse derartig spezifiziert sind, so fein auf alle Verhältnisse abgestimmt sind, daß sie bei jedem kleinsten, äußerlich nicht wahrnehmbaren Verstoß gegen diese Bedingungen geschädigt werden.

Wie schon im Anfang erwähnt wurde, war die Zeit, die von der Impfung bis zum Auftreten der Gasentwicklung verstrich, sehr verschieden. Besonders groß waren diese Unterschiede bei den verschiedenen Impfmaterialien, die verwendet wurden; am größten z. B. zwischen Schlamm, Torf einerseits und Erde andererseits. Diese Unterschiede stellten sich auch ein, wenn die Anfangskulturen mit möglichst gleichen Mengen (wiederum gleiche Platinösen) der verschiedenen Böden beimpft wurden. So konnte man denn aus diesem Esgebnis darauf schließen, daß die Anzahl der Bakterien in den verschiedenen Impfstoffen eine verschieden große wäre. Stellt man diese verschiedenen Zeitintervalle, die bis zum Auftreten der Gasentwicklung beobachtet wurden, zusammen, so kommt man zu folgender Tabelle:

Torf	2 Tage
Schlamm, Buchenwaldboden	4 „
Ackererde	7 „

[1]) Ritter, Fühlings landw. Ztg. 1912. p. 593.

Es ergibt sich also die Tatsache, daß die Zahl der untersuchten Bakterien in Erde am kleinsten, im Torf am größten ist. Im Buchenwaldboden, Kompost, Schlamm nimmt sie eine Mittelstellung ein. Dies würde ein Ansteigen der Bakterienzahl bedeuten bei Steigerung des Gehaltes an organischer Substanz des Impfmateriales.

Dieses Ergebnis wurde durch weitere Untersuchungen gestutzt. So trat bei einer Kultur, die mit mistgedüngtem Ackerboden geimpft wurde, eine Gasentwicklung nach vier Tagen auf; bei Impfung mit einem jahrelang ungedüngten Boden erst nach sieben Tagen bei gleicher Menge des Impfmateriales. Ferner wurden Versuche mit Erde angesetzt, die mit verschiedenen Mengen von Hühnereiweiß als schwefelhaltiger organischer Substanz versetzt war. Nachdem diese Kulturen einige Wochen im Brutzimmer bei 25° gestanden hatten, wurden von ihnen gleiche Mengen (gleiche Platinösen) zum Impfen in Erlenmeyerkolben unter Quecksilberabschluß benutzt. Es ergaben sich folgende Resultate:

3% Eiweiß: Gasbildung nach 1 Tage.
1% „ „ „ 2 Tagen.
ohne „ „ „ 7 „

Für alle drei Versuche wurden nach 14 Tagen Nitratbestimmungen der Nährflüssigkeit gemacht. Es ergab sich folgender Nitratverbrauch pro 100 ccm Flüssigkeit, wenn in der ursprünglichen Nährlösung 70 mg Nitratstickstoff pro 100 ccm Flüssigkeit vorhanden gewesen waren:

3% Eiweiß: alles Nitrat verbraucht.
1% „ 58,8 mg Nitratstickstoff verbraucht
ohne „ 34,0 mg „ „

Die Zahlen zeigen wohl zur Genüge, welchen Einfluß der Gehalt an organischer Substanz auf die Zahl dieser Bakterien an den verschiedenen Standorten hat.

Hiermit soll nun nicht gesagt werden, daß die organische Substanz direkt von Einfluß auf die Thiosulfatbakterien ist, denn Lieske hatte ja nachgewiesen, daß ein Zusatz von organischer Substanz zur Nährlösung die Umsetzungen dieser Bakterien nicht erhöht. Hier soll der Gehalt an organischer Substanz zunächst nur eine Charakteristik der Bodenart vorstellen. Allerdings kann man sich ja denken, daß durch den Zerfall größerer Mengen von organischer Substanz die Menge des für diese Thiosulfatbakterien nötigen Energiematerials erhöht wird. Bekannt ist ja das Auftreten von Schwefelwasserstoff in faulenden organischen Massen. Und außerdem wird durch die größere Menge organischer Substanz auch wohl der Gehalt an Kohlensäure im Boden wesentlich erhöht. Und spätere Versuche zeigen, daß diese Erhöhung wohl von großem Einfluß sein kann. Dies alles wäre dann aber nur eine indirekte Wirkung der organischen Substanz.

Kapitel V.

Unterscheidung von Rassen der Lieskeschen Bakterienform in den verschiedenen Bodenarten.

In dem vorhergehenden Kapitel war festgestellt, daß bei der Beimpfung einer gleich großen Menge von Nährlösung mit gleichen Mengen von Ackererde, Komposterde usw. Differenzen in dem Auftreten der Gasbildung sich zeigten, die man durch den verschiedenen Gehalt der Böden an Zellen der vorliegenden Bakterienart erklären kann. Impfte man nun aber von diesen

Bakterienkulturen eine gleiche Menge von Bakterien von neuem über in eine gleiche Menge von Nährlösung, so traten ebenfalls noch Unterschiede in der Zeitdauer bis zur Gasentwicklung auf, die man nun auf andere Weise erklären muß.

Es ließen sich z. B. folgende Differenzen feststellen:

Torf	2 Tage
Schlamm, Buchenwaldboden, Kompost	3—4 Tage
Ungedüngte Ackererde	5—6 „

Auch hier zeigt sich, daß die Zeit bis zur Gasbildung in Erde am längsten, am kürzesten im Torf und Schlamm ist, daß also auch hier noch eine Kürzung der Zeit eintritt bei steigendem Gehalt des ursprünglichen Impfmateriales an organischer Substanz. Nachdem die Kulturen etwa ein Vierteljahr lang dauernd weiter übergeimpft waren, waren diese Unterschiede gänzlich verschwunden. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß in den verschiedenen Impfmaterialien wohl verschiedene Rassen ein und derselben Art vorliegen, deren Umsetzungsfähigkeit je nach der Gunst ihrer Standorte steigt oder fällt. Da z. B. die Ackererde im Verhältnis zum Torf doch sehr arm an organischer Substanz ist, scheint sich hier durch Anpassung allmählich eine Rasse ausgebildet zu haben, deren Umsetzungen bedeutend geringer sind als die derselben Bakterienart im Torf oder Schlamm. Auch diese Vermutung läßt sich an der Hand der Nitratumsetzungen näher belegen. In 100 ccm Nährlösung waren 70 mg Nitratstickstoff vorhanden. Davon waren bei Beendigung der Gasentwicklung verbraucht:

durch Torfbakterien	32,4 mg Nitratstickstoff
durch Bakterien aus ungedüngtem Boden	7,6 mg „

Dabei waren beide Versuche, wie schon erwähnt wurde, mit gleicher Bakterienzahl (es wurde stets eine gleich große Öse des Platindrahtes benutzt) geimpft aus Kulturen, die durch mehrmaliges Überimpfen in Thiosulfatlösungen fast rein die untersuchte Form enthielten. — Es zeigt sich also, daß die Torfbakterien bedeutend kräftiger sind als die Erdbakterien, wodurch die angegebenen Unterschiede in der Zeitdauer, die bis zum Auftreten der Gasbildung verbraucht wird, sehr gut zu erklären sind.

Später noch zu erwähnende Versuche in Erde, Kompost usw. ergeben das gleiche Resultat hinsichtlich der Nitratumsetzungen. So würde sich denn auch die Differenz, die anfangs zwischen den Schlammbakterien von Lieske und den hier vorliegenden Schlammbakterien erwähnt wurde, so aufklären, daß selbst unter den Schlammbakterien je nach ihren Standorten Bakterien mit verschiedener Umsetzungsfähigkeit auftreten.

Alle diese Versuche wurden mit Rohkulturen angesetzt. Bei der mikroskopischen Untersuchung dieser Kulturen zeigte sich aber, daß nur ganz vereinzelt andere Bakterien vorhanden waren. So darf man wohl unbekümmert die hier sich ergebenden Resultate auf die in dieser Arbeit speziell behandelte Bakterienart übertragen.

Kapitel VI.

Umsetzungen dieser Bakterienart bei steigendem Thiosulfatgehalt.

Auch die folgenden Untersuchungen wurden mit Rohkulturen ausgeführt, da sie anfangs nur als Vorversuche angestellt wurden. Doch bestehen auch hier für sie die gleichen Verhältnisse bezüglich der Reinheit der Kulturen. Es wurde untersucht, wie die Umsetzungen der Bakterien sich än-

dern bei steigendem Thiosulfatgehalt, Nitratgehalt usw.; diese Versuche sollten also Aufschluß geben über die Umsetzungen dieser Bakterienart unter wechselnden Bedingungen, wie sie auch wohl in der Natur auftreten können.

Zunächst wurde in Nährlösung untersucht, bis zu welcher Konzentration diese Bakterien das Thiosulfat ertragen können. Und da ergab sich das merkwürdige Resultat, daß erst bei 5 Proz. Thiosulfat kein Wachstum der Bakterien mehr eintrat. Dabei trat die sonderbare Erscheinung auf, daß sich in den höheren Konzentrationen stets eine sehr erhebliche Schwefelausscheidung bemerkbar machte, die man bei der gewöhnlichen Konzentration von 0,5 Proz. Thiosulfat nicht bemerkte. Die Flüssigkeit sah zum Schlusse direkt milchig aus. Scheinbar wurde durch diese lebhafte Zersetzung des Thiosulfates es den Bakterien ermöglicht, das Thiosulfat in solch hoher Konzentration zu ertragen.

Woher kam nun diese Zersetzung? War die Ausscheidung des Schwefels ein Lebensprozeß dieser Bakterien, oder erfolgte sie rein chemisch? Da die verbrauchte Nährlösung noch neutral reagierte, wurde versucht, ob die bei der Dissimilation entstehende Kohlensäure diese Zersetzung verursachen konnte. Da die Kulturen unter Luftabschluß standen, reicherte sich die Nährlösung natürlich an Kohlensäure an. Und bekannt ist ja[1]), daß die Thiosulfate durch nicht allzu verdünnte Mineralsäuren zersetzt werden. Der Versuch ergab denn auch die Richtigkeit dieser Vermutung. Beim Durchleiten von Kohlensäure durch eine 2-proz. Thiosulfatlösung stellte sich nach ganz kurzer Zeit eine lebhafte Schwefelabscheidung ein. So kann diese Zersetzung durch Kohlensäure wohl dazu dienen, das Leben dieser Bakterien in solch hohen Thiosulfatkonzentrationen zu erklären. Aber selbstverständlich mußten die Thiosulfatbakterien erst angewachsen sein in diesen Nährlösungen, ehe eine Zersetzung des Thiosulfates durch CO_2 erfolgen konnte. Und bis dieses erfolgt war, mußten die Bakterien doch die Fähigkeit besitzen, hohe Thiosulfatkonzentrationen ohne wesentliche Schädigung zu ertragen. Über das Verhalten unbeimpfter Thiosulfatlösungen vgl. die Ausführungen p. 2 und p. 5.

Daß bei den Thiosulfatbakterien eine extrazelluläre Schwefelabscheidung erfolgt, war von vornherein bekannt. Dieses Merkmal diente ja gerade dazu, die Thiosulfatbakterien von den anderen Schwefelbakterien abzutrennen, die Schwefel intrazellulär abscheiden. Nach Nathansohn erklärte sich dieser Vorgang dadurch, daß durch die Bakterien Tetrathionsäure gebildet wird, welche mit Thiosulfat zusammengebracht rein chemisch eine Schwefelabscheidung veranlaßt, wie Versuche von Nathansohn ergaben. Beijerinck schloß sich dieser Auffassung nicht an. Er vertrat vielmehr den Standpunkt, daß die Schwefelabscheidung ein Lebensprozeß sei, indem die Bakterien das Thiosulfat in folgender Weise umsetzen: $Na_2S_2O_3 + O = Na_2SO_4 + S$.

Lieske lehnte es ab, sich über diese Fragen zu verbreiten. Auch hier soll eine Entscheidung in dieser Sache nicht gefällt werden. Nur muß man es nach dem obigen Versuch als erwiesen betrachten, daß auch die Kohlensäure einen gewissen Einfluß bei der Ausscheidung des Schwefels neben den anderen Faktoren hat.

Im Anschluß hieran wurde untersucht, wie sich die Nitratumsetzungen

[1]) Erdmann, Lehrb. d. anorg. Chem. 1910. p. 272.

bei steigendem Thiosulfatgehalt gestalten. Auch hier wurde der Nitratverbrauch quantitativ mit Hilfe der alkalischen Reduktionsmethode bestimmt, die im III. Teil näher erläutert wird. Die Versuche wurden abgebrochen, nachdem die Gasentwicklung aufgehört hatte, und daher die Umsetzungen beendigt waren. Enthielt die Nährlösung 70 mg Nitratstickstoff pro 100 ccm Nährlösung, so wurde bei steigendem Thiosulfatgehalt pro 100 ccm Lösung verbraucht:

0,5%	Thiosulfat	17,8 mg	Nitratstickstoff
2,0%	„	19,2 mg	„
4,0%	„	50,5 mg	„

Es zeigt sich also bei 4 Proz. Thiosulfat ein sehr erhebliches Ansteigen des Nitratverbrauches. Rechnet man allerdings diese Werte auf Nitratzersetzung pro 1 g wirklich verbrauchtes Natriumthiosulfat um, so gelangt man zu folgenden Werten:

0,5%	Thiosulfat	89,0 mg	Nitratstickstoff
2,0%	„	68,0 mg	„
4,0%	„	68,3 mg	„

Wie auch bei anderen bakteriologischen Prozessen, fällt auch hier der Umsetzungsfaktor bei Steigerung der Menge des Energiematerials sehr schnell. Nur in den höheren Konzentrationen wie 2 Proz. und 4 Proz. Thiosulfat ist der Umsetzungsfaktor gleich.

Kapitel VII.

Ersatz des Nitrates durch andere Sauerstoffquellen.

Bei seinen Untersuchungen über nitratzerstörende Bakterien hatte F r e d [1]) im hiesigen Institut auch das Verhalten dieser Organismen gegenüber Farbstoffen behandelt, um zu untersuchen, welche Substanzen von diesen Bakterien neben dem Nitrat noch als Sauerstoffquellen benutzt werden können. Und in ähnlicher Weise sollte auch die vorliegende Bakterienform untersucht werden.

Zunächst wurde das Verhalten der Bakterien gegenüber Phenolphtaleïn beobachtet. Die Kulturen wurden in Reagenzröhrchen angesetzt, deren Nährlösung durch Zusatz von Phenolphtaleïn rot gefärbt war (das Bikarbonat war natürlich durch Karbonat ersetzt). Der Luftsauerstoff war durch eine 2 cm hohe Paraffinschicht abgeschlossen. Zugleich mit dem Auftreten der Gasentwicklung trat auch eine Entfärbung der Kulturen ein. Es war aber keine Zersetzung des Farbstoffes eingetreten; denn durch Zusatz von neuem Phenolphtaleïn zur Nährlösung erhielt man keine Rotfärbung. Dadurch, daß die Kohlensäure nicht aus der Flüssigkeit entweichen konnte, war vielmehr ein Reaktionsumschlag eingetreten. Diese Tatsache ließ sich dadurch nachweisen, daß man der Nährlösung neue Karbonatlösung hinzufügte. Sofort trat die Rotfärbung wieder auf. Erst nach Beendigung der Gasbildung trat ganz allmählich wieder eine Rotfärbung der Kultur ein. Der Abschluß der Kultur durch Paraffin war nicht dicht genug, so daß im Laufe der Zeit die aufgespeicherte Kohlensäure aus der Kultur entweicht und die ursprüngliche Reaktion der Nährlösung wieder eintritt. In allem zeigte dieser Farbstoff bei diesen Bakterien das gleiche Verhalten, wie es von F r e d angegeben war.

[1]) F r e d, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 32. p. 421.

In jeder Beziehung ähnlich verhielt sich Lackmus, wie auch schon Fred angegeben hatte. Bei Auftreten der Gasbildung trat eine Rotfärbung auf, bei Nachlassen der Gasbildung ging die Farbe langsam wieder in Blau über. Für Methylenblau hatte Fred angegeben, daß dieser Farbstoff bei Sauerstoffabschluß durch die Bakterien zur Leukoverbindung reduziert wurde. Erst nachdem die Paraffinschicht entfernt war, trat die blaue Farbe der Lösung wieder auf. Dieses Ergebnis der Fred schen Untersuchungen konnte leider nicht nachgeprüft werden. Auf die vorliegende Bakterienart wirkte dieser Farbstoff nämlich streng giftig. Obwohl mehrmals die Versuche auch unter anderen Sauerstoffabschlüssen (Burri-Wright scher Verschluß, Abschluß durch Wasserstoff) wiederholt wurden, gelang es doch niemals, nur das geringste Wachstum von Bakterien in den schwachen Konzentrationen von Methylenblau zu beobachten. In der Konzentration des zugesetzten Methylenblaus richtete ich mich genau nach den Angaben von Kruse [1]), der jedem Reagenzröhrchen 1—4 Tropfen einer ½-proz. Lösung zusetzte. Selbstverständlich wurde zu allen Versuchen chemisch reines Methylenblau (Methylenblau med. pur.) benutzt.

So war bisher kein positives Resultat in der Frage nach einem Ersatz des Nitrates als Sauerstoffquelle erzielt worden. Und weitere Untersuchungen ergaben auch keinen weiteren Aufschluß. Interessant ist ja diese Frage aus mancherlei Gründen. So sind durch Christensen [2]) in fast allen Hochmoorproben denitrifizierende Bakterien nachgewiesen worden, und auch die vorliegende Bakterienart war in Torf reichlich vorhanden, trotzdem doch Ritter [3]) niemals in Torf Nitrat nachweisen konnte, und Christensen [4]) in Impfversuchen niemals nitratbildende Bakterien nachweisen konnte. Da könnte man sich doch den Gegensatz zwischen diesen Befunden so erklären, daß die denitrifizierenden Bakterien im Torf hauptsächlich andere Sauerstoffquellen als Nitrat benutzen. So wurde denn ein Versuch angesetzt, ob vielleicht Sulfate als Sauerstoffquellen für die Thiosulfatbakterien dienen könnten; aber auch hier gab es nur negative Erfolge. Es erfolgte in diesen Kulturen, die neben Thiosulfat 0,2 Proz. Natriumsulfat enthielten, noch nicht einmal ein Anwachsen der Bakterienhäutchen. Diese Tatsache erhält eine Bestätigung in einer kürzlich erschienenen Arbeit von J. Vogel [5]), der einen schädigenden Einfluß auf Nitratbildung in Erde konstatieren konnte, wenn er 0,1 Proz. Na_2SO_4 dem Boden zusetzte.

So muß man denn bei diesen denitrifizierenden Thiosulfatbakterien der Annahme zuneigen, daß sie nicht die Fähigkeit haben, andere Sauerstoffquellen als Nitrate auszunutzen.

Kapitel VIII.

Andere Energie- und Kohlenstoffquellen.

Um zu beobachten, ob zwischen Karbonat und Bikarbonat als Kohlenstoffquelle ein Unterschied festzustellen ist, wurde auch nach dieser Hinsicht ein Versuch angestellt. Es ergaben sich folgende Resultate:

---

[1]) Kruse, Mikrobiol. 1910. p. 478.
[2]) Christensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. p. 414.
[3]) Ritter, a. a. O.
[4]) Christensen, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. p. 414.
[5]) Vogel, J., Die Einwirkung von Schwefel auf die bakteriellen Leistungen des Bodens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. p. 60.)

	Thiosulfat-verbrauch %	Nitrat-verbrauch mg Nitrat-N
Karbonat	0,36	19,7
Bikarbonat	0,37	22,1

Es zeigt sich also, daß das Bikarbonat wohl ein klein wenig günstiger wirkt als das Karbonat.

Ferner wurde untersucht, wie nun überhaupt der Denitrifikationsprozeß dieser Bakterien verläuft. Es ließ sich feststellen, daß zunächst von diesen Bakterien Nitrit gebildet wurde, welches sodann zu freiem Stickstoff weiter reduziert wurde. Eine Reduktion der Salpetersäure zu Ammoniak fand nicht statt.

Auch sollten fortlaufende Untersuchungen darüber ausgeführt werden, wie in den einzelnen Zeitabschnitten die Denitrifikation vor sich geht. Hierzu sollte die kolorimetrische Nitratbestimmung von Sprengel [1]) verwendet werden, weil diese Methode ein sehr schnelles und ausgedehntes Arbeiten gestattet. Nach vielen Versuchen mußte diese Absicht aber aufgegeben werden. weil die Schwefelverbindungen scheinbar einen Einfluß auf den Farbstoff ausübten, so daß die Methode in diesem Falle gänzlich unbrauchbar war. Es traten nämlich bei zwei Nährlösungen mit gleichem Nitratgehalt mit und ohne schwefelhaltige Verbindungen derartige Nuancen in der Farbe auf, daß ein Arbeiten mit dieser Methode gänzlich ausgeschlossen war. — Darauf wurde dann auch hier quantitativ das Nitrat mit Hilfe der alkalischen Reduktionsmethode bestimmt, und zwar wurde dieser Versuch in der Weise angesetzt, daß mehrere Kölbchen mit der gewöhnlichen Nährlösung mit gleichen Bakterienmengen beimpft wurden, und daß ungefähr alle zwei bis drei Tage ein Kölbchen auf Nitratverbrauch untersucht wurde, bis der Versuch beendet war.

Tage	Nitratverbrauch in mg pro 100 ccm Nährlösung
0	—
2	— 1,1 mg
5	— 2,2 mg
8	— 9,8 mg
13	— 22,8 mg

Die Beschleunigung der Nitratzersetzung am Schluß des Versuches kann man vielleicht so deuten, daß vom 5. Tage ab der in jedem Gefäß in Spuren vorhandene Sauerstoff verbraucht ist, und daß deshalb von diesem Tage ab erst ein ungehindertes Wachstum der Bakterien eintritt.

Zum Schluß wurde auch in dieser Arbeit wie in den bisher erschienenen Veröffentlichungen über Thiosulfatbakterien untersucht, inwieweit für diese Bakterien ein Ersatz der Energiequelle stattfinden kann. Hierbei wurde nicht nur untersucht, welche Schwefelverbindungen als Energiequelle für diese Bakterienart dienen können, weil eben das Thiosulfat nur sehr selten in der Natur vorkommt und somit diese Bakterien wohl fast immer auf ein Gemisch von Schwefelverbindungen als Energiematerial angewiesen sind. Es sollte hier außerdem noch untersucht werden, ob nicht vielleicht ganz anders geartete Substanzen als Energiequellen dienen können. Vor allen Dingen kamen Salze von Selen und Tellur in Frage, von denen nachgewiesen ist, daß sie von anderen Schwefelbakterien als Energiequelle verwendet werden

[1]) Zeitschr. f. anal. Chem. Bd. 52. p. 137.

können. Die Versuche wurden derart angesetzt, daß die gewöhnliche Nährlösung verwendet wurde, in der das Thiosulfat durch 0,5 Proz. und 0,1 Proz. Na_2SeO_3 und Na_2TeO_3 ersetzt war. Die Kulturen wurden sowohl mit Rohkulturen, wie auch mit Reinkulturen beimpft. Es stellte sich aber niemals bei Verwendung dieser Energiematerialien ein Wachstum ein. Auch Zellulose, Ammoniumsulfat wurden als Energiematerial benutzt. Aber auch hier erfolgte niemals ein Wachstum.

In später zu beschreibenden Erdversuchen wurde auch noch Ferrosulfat, Manganosulfat als Energiequellen verwendet, weil doch gerade Eisen und Mangan in dem Stoffwechsel gewisser Bakterien eine wichtige Rolle spielen, und weil gerade diese Elemente leicht oxydierbar sind. Aber auch in diesen Versuchen ließ sich nachweisen, daß durch diese Substanzen das Thiosulfat nicht zu ersetzen war, daß also die vorliegenden Thiosulfatbakterien einzig und allein auf Schwefelverbindungen als Energiequelle für ihre Umsetzungen angewiesen sind.

Wie schon einmal hervorgehoben war, wurden alle diese Untersuchungen mit Rohkulturen angestellt. Auf den ersten Blick wird es sonderbar erscheinen, daß energetische Umsetzungen mit Rohkulturen untersucht wurden. Aber da ja niemals ein Wachstum eintrat, wurde eindeutig bestimmt, daß das Thiosulfat als Energiematerial für diese Bakterien nicht zu ersetzen war. Im Anschluß hieran sollten alle Versuche mit Reinkulturen nachgeprüft werden, da es ja gelungen war, in einer Wasserstoffatmosphäre in Reagenzröhrchen Reinkulturen zu erhalten. Alle Versuche wurden also neu angesetzt und von der Luft durch steriles Paraffin abgeschlossen, indem die Flüssigkeitsoberfläche mit einer ca. 3 cm dicken Paraffinschicht versehen wurde. Nach drei Wochen war in keiner Kultur ein Wachstum erfolgt. Es wurde nun angenommen, daß vielleicht der Luftzutritt doch noch zu groß gewesen war. Alle Versuche wurden daher erneut angesetzt und durch Überleiten von Wasserstoff von der Luft abgeschlossen. Auch hier war nach 3—4 Wochen ein Wachstum nirgends zu beobachten. Dieser Versuch wurde noch einmal wiederholt, aber auch dann wurde trotz reichlicher Überimpfung keim Wachstum erzielt. Zum Schluß wurden dann die Versuche in Gefäßen angesetzt, von denen durch den Burri-Wrightschen Verschluß aller Sauerstoff abgehalten war. Aber auch hier war nach fünf Wochen nicht das geringste Wachstum zu beobachten.

Nach all diesen fehlgeschlagenen Versuchen mußte es leider aufgegeben werden, in Reinkulturen alle Untersuchungen nachzuprüfen. Woran es liegt, daß in den Versuchen mit größeren Mengen von Nährflüssigkeit niemals ein Wachstum der Reinkulturen eintrat, blieb vollkommen unaufgeklärt.

So kann denn nur noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die benutzten Rohkulturen durch dauerndes Überimpfen fast rein vorlagen, so daß man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen kann, daß die mit Rohkulturen erhaltenen Resultate innerhalb enger Grenzen den wirklichen Umsetzungen der autotrophen, anaëroben denitrifizierenden Thiosulfatbakterien von Lieske entsprechen.

III.

In einem weiteren Teile dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, in welchem Maße die denitrifizierenden Thiosulfatbakterien teilhaben an den Nitratumsetzungen in der Natur. Hierzu wurden Versuche in Erde, Kompost-

erde, Torf usw. angesetzt, da ja Koch und Pettit[1]) gezeigt hatten, daß die Umsetzungen der Bakterien in Nährlösungen ganz andere sind, als z. B. in Erde. Ferner sollte die Frage beantwortet werden, ob auch diese ganz spezifische Bakterienart dieselben Eigenschaften im allgemeinen Verhalten zeigt wie die gewöhnlichen denitrifizierenden Bakterien. Zugleich konnten dann die Ergebnisse dieser Untersuchungen als neue Stützen früherer Erfahrungen dienen.

Die Nitratbestimmungen wurden nach der hier in unserem Institut gebräuchlichen alkalischen Reduktionsmethode ausgeführt. Es wurde stets auf die Erfahrung geachtet, daß diese Methode etwas ungenau wird, wenn die Nitratmenge pro Versuch zu klein oder zu groß wird. Die Vorlage war daher nie größer als 20—25 ccm $^1/_{10}$ n. H_2SO_4[2]). Auf diese Weise wurden dann auch stets sehr gut übereinstimmende Werte bei den Parallelbestimmungen erzielt.

Der Thiosulfatgehalt wurde stets durch Titration mit $^1/_{100}$ n. Jodlösung in bekannter Weise ermittelt. Zu allen Versuchen wurde natürlich möglichst gleichmäßige Erde usw. verwendet. Außerdem wurde ständig darauf geachtet, daß der Wassergehalt der Erde usw. stets gleichmäßig blieb, indem das Gewicht der Gefäße durch Zusatz von destilliertem Wasser auf gleicher Höhe erhalten wurde.

Kapitel I.

Verhältnis anderer denitrifizierender Bakterien zu Thiosulfat und Nachweis und Verlauf von Nitratzersetzung im Boden durch Thiosulfat als Energiematerial.

Zunächst mußte erst das Verhältnis anderer denitrifizierender Bakterien zum Thiosulfat festgestellt werden, um später klare und eindeutige Versuchsergebnisse zu erhalten.

Die gewöhnliche Nährlösung für autotrophe, denitrifizierende Thiosulfatbakterien wurde mit verschiedenen Reinkulturen gewöhnlicher denitrifizierender Bakterien geimpft. Es trat in keinem Falle ein Wachstum ein. Fügte man aber dieser Nährlösung eine organische Substanz als Energiematerial zu — z. B. Zitronensäure, — so erfolgte stets Wachstum, selbst in Nährlösungen, die mit 4 Proz. Thiosulfat versetzt waren. Ob hierbei von den Bakterien neben der organischen Substanz auch das Thiosulfat angegriffen war, war leider nicht zu entscheiden, da ja stets durch die auftretende Kohlensäure Thiosulfat zersetzt wurde, wie im Anfang dieser Arbeit gezeigt war. Wahrscheinlich ist es ja nicht, daß das Thiosulfat auch von anderen denitrifizierenden Bakterien angegriffen wird, sonst wäre doch in der gewöhnlichen, am Anfange dieser Arbeit erwähnten Thiosulfat-Nährlösung wenigstens ein geringes Wachstum erfolgt. Somit war anzunehmen, daß, wenn im Boden durch Thiosulfatzusatz eine Nitratabnahme erfolgt, dieser Nitratverbrauch auf autotrophe denitrifizierende Thiosulfatbakterien zurückzuführen war.

Um eine Nitratabnahme in Erde mit Thiosulfat als Energiematerial nachzuweisen, wurden folgende Versuche angesetzt:

1. 2 kg Erde wurden mit 1 Proz. Thiosulfat versetzt, außerdem wurde 0,5 Proz. Kaliumnitrat als Lösung quantitativ zugesetzt.

2. 2 kg Erde wurden mit 0,5 Proz. Kaliumnitrat quantitativ versetzt. Dieser Versuch sollte ergeben, wie sich größere Nitratmengen in einem Boden von etwa 18 Proz. Feuchtigkeit verhalten, ohne daß irgendein Energiematerial zugesetzt wurde.

---

[1]) Koch u. Pettit, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 26. p. 335.

[2]) Seydel, S. u. Wichers, L., Zeitschr. f. angew. Chem. 1911. p. 2046.

3. 2 kg Erde wurden unbehandelt angesetzt, um die Nitratzunahme des verwendeten Bodens in einer bestimmten Zeit anzugeben.

Die benutzte Erde stammte vom hiesigen Versuchsfeld und war ein milder Lehmboden. Die Feuchtigkeit betrug ungefähr 18 Proz in allen Versuchen.

Nach etwa 5 Wochen wurden diese Versuche abgebrochen. Es ergab sich, daß in dem Versuch mit 1 Proz. Thiosulfatzusatz eine Nitratabnahme von 5,8 mg Nitrat-N pro 100 g trocknem Boden erfolgt war. In dem Versuche, der nur mit 0,5 Proz. Kaliumnitrat versetzt war, fand sich die gleiche Menge Nitrat wieder vor. Der 3. Versuch ergab schließlich eine Zunahme von 0,2 mg Nitratstickstoff pro 100 g trocknem Boden. (Vgl. hierfür am Ende der Arbeit Tabelle 1, Versuch 1, 2 und 3.) Am klarsten erkennt man die Resultate aus der nachfolgenden Tabelle:

No.	H_2O %	Thiosulfat in %	Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde in mg N am Anfang	am Ende	±
1.	18,4	—	1,1	1,3	+ 0,2
2.	18,4	—	89,9	86,8	— 0,1
3.	18,4	1,0	86,9	81,1	— 5,8

Somit ergibt sich also in Wirklichkeit eine Nitratabnahme von 5,8 + 0,2 = 6,0 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockenem Boden. Hierdurch war also wirklich eine Nitratzersetzung im Boden durch Thiosulfat als Energiequelle festgestellt.

In gleicher Weise wurde zur Kontrolle eine zweite Versuchsreihe angesetzt. Hier ergab sich nach 6 Wochen eine Abnahme von 4 mg Nitratstickstoff, nach 8 Wochen eine Abnahme von 11,8 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde. Daß diese Werte etwas geringer sind als die anfangs aufgeführten, erklärt sich daraus, daß hier nur 0,5 Proz Thiosulfat zugesetzt war. Rechnet man sie auf den gleichen Thiosulfatgehalt um, so erhält man eine Nitratabnahme von 8,2 mg bzw. 23,9 mg Nitratstickstoff. (Vgl. Tabelle 1, Versuch 4, 5 und 6.)

Es war also durch verschiedene, stets die gleichen Resultate ergebende Parallelversuche ganz sicher festgestellt, daß auch im Boden durch Thiosulfatbakterien Nitratzersetzungen stattfinden können. Allerdings sind diese Umsetzungen im Verhältnis zu anderen denitrifizierenden Bakterien mit organischer Energiequelle sehr geringe, in 8 Wochen rund 12 mg Nitratstickstoff.

In ganz gleicher Weise wurden dieselben Versuche mit Komposterde angestellt. Und auch hier ergaben sich die gleichen Resultate, wie aus der folgenden Tabelle klar ersichtlich ist.

No.	H_2O %	Thiosulfatgehalt in % des feuchten Bodens	Nitratstickstoff in mg pro 100 g trocknem Boden Anfang	Ende	±
1.	26,4	—	7,3	13,4	+ 6,1
2.	26,4	—	102,4	108,6	+ 6,2
3.	26,4	1,0	102,4	81,4	— 21,0

Die Versuchsdauer war auch hier 5 Wochen, also die gleiche Zeit wie bei den Erdversuchen.

Gewöhnliche Komposterde zeigt in dieser Zeit eine Zunahme von etwa 6 mg Nitratstickstoff pro 100 g trockener Erde, ganz gleich, ob im Anfange 7 oder 100 mg Nitratstickstoff in 100 g trocknem Boden vorhanden waren. Aus dem Vorrat an organischer Substanz in der Komposterde erfolgt also

keine äußerlich an Nitratverlusten wahrnehmbare Nitratzersetzung. So ist denn der Nitratverbrauch von 21,0 mg Nitratstickstoff, der in Wirklichkeit sogar nach Versuch 1 21 + 6,1 = 27,1 mg groß ist, lediglich durch Thiosulfatbakterien erfolgt.

Also auch hier kann, wie in gewöhnlicher Ackererde, die Tatsache konstatiert werden, daß in der Komposterde beträchtliche Nitratzersetzungen vor sich gehen, bei denen Thiosulfat als Energiematerial verwendet wird.

Auch für Buchenwaldboden und Torf wurden die gleichen Versuche angesetzt.

Der Buchenwaldbodenversuch bei gewöhnlichem Wassergehalt wurde leider erst zu spät untersucht, so daß schon wieder eine Nitratzunahme erfolgt war. Dies ist jedoch eine Tatsache, die auch in Erde und Kompost bei längerem Stehen in ganz gleicher Weise eintritt. Sie soll im Zusammenhang weiter unten behandelt werden. Ein Versuch mit Buchenwaldboden mit höherem Feuchtigkeitsgehalt hatte dagegen einen wesentlichen Nitratverbrauch ergeben. (Vgl. Tabelle II, Versuch 7 und 8.) Aus allen Ergebnissen ist der Schluß zu ziehen, daß auch im Buchenwaldboden eine Nitratzersetzung durch Thiosulfat als Energiematerial erfolgt.

Auch für den Torf ergab sich das gleiche Resultat. Enthielten 100 g Trockensubstanz 330 mg Nitratstickstoff — der hohe Nitratgehalt erklärt sich durch den enormen Feuchtigkeitsgehalt des Torfes — so zeigte sich nach 14 Wochen ein Nitratverbrauch von 216 mg Nitratstickstoff (vgl. hierzu Tabelle 2, Versuch 9).

Somit ergibt sich das interessante Resultat, daß in allen untersuchten Böden Nitratzersetzungen mit Hilfe von Thiosulfat als Energiematerial vor sich gehen. Selbstverständlich zeigten quantitative Thiosulfatbestimmungen einen starken Thiosulfatverbrauch an. Hierdurch erhielt natürlich die im Anfang gemachte Angabe, daß die von Lieske näher bearbeitete, autotrophe denitrifizierende Thiosulfatbakterienart auch in allen vorliegenden Bodenarten vorkommt, eine wesentliche Stütze.

Wenn die Umsetzungen dieser Bakterien auch lange nicht so groß sind wie die der gewöhnlichen heterotrophen Denitrifikationsbakterien, so steigt doch die allgemeine Bedeutung der Thiosulfatbakterien durch ihre außerordentliche Verbreitung. Nach den vorliegenden Tatsachen ist doch die Annahme berechtigt, daß sie wohl in jeder Bodenart vorkommen werden.

Über den weiteren Verlauf der Denitrifikation im Ackerboden ist noch zu bemerken, daß sie allmählich steigt bis zum Verbrauch des Energiematerials und daß dann plötzlich eine äußerst lebhafte Nitrifikation einsetzt. Wie schon mehrfach erwähnt wurde, läßt es sich nicht genau feststellen, wann das Energiematerial verbraucht ist. Die folgenden Tabellen machen es aber wahrscheinlich, daß die Nitratumsetzungen in der eben erwähnten Weise vor sich gehen. Der folgende Versuch mag dies genauer zeigen:

Nitratzersetzung pro 1,0% $Na_2S_2O_3$ u. 100 g Trockensubstanz

nach	5	Wochen	— 6,0 mg Nitrat-N
„	6	„	— 8,2 „ „
„	8	„	— 23,9 „ „
„	10	„	— 5,2 „ „
„	13	„	+ 1,3 „ „

Diese Erscheinung tritt sowohl im Ackerboden, Kompost, wie auch im Buchenwaldboden auf. Daß die Nitratbildung eintritt, wenn das Energie-

material verbraucht ist, geht aus folgendem Versuch hervor, der nach 13 Wochen abgebrochen wurde:

0,5 %	Thiosulfat	+ 2,9 mg	Nitrat-N
1,0 %	„	+ 1,3 „	„
2,0 %	„	— 10,3 „	„

In diesen Versuchen wurde das in Versuchen ohne Thiosulfatzusatz gefundene Nitrat natürlich abgezogen, so daß also wirklich eine Nitratneubildung vorliegt, die das anfangs vorhanden gewesene Nitrat übertrifft.

Aus diesen Versuchen geht also mit großer Deutlichkeit hervor, bis zu welchem Betrage die Nitratzersetzung steigen kann, und mit welcher Intensität das Nitrat zurück- und neugebildet wird. In später ausführlicher zu besprechenden Versuchen, über deren Stickstoffumsatz genaue Gesamtanalysen angestellt wurden, tritt diese Tatsache besonders hervor, indem die durch Denitrifikation veranlaßte Abnahme des Gesamtstickstoffs größer ist als die am Schluß gefundene Nitratzersetzung. Diese Tatsache ist eben auch so zu erklären, daß die wirklich vorhanden gewesene Nitratzersetzung nach Verbrauch des Energiematerials durch die dann auftretende lebhafte Nitratbildung verdeckt wird. Diese schnelle Nitrifikation erklärt sich einmal daraus, daß das meiste Nitrat zu Eiweiß in Bakterien umgesetzt ist, woraus das Nitrat sehr leicht zurückgebildet werden kann. Daneben mußte aber auch eine sehr lebhafte Nitratneubildung stattfinden. Es fiel auf, daß sich am Schluß der Versuche der Boden stets in einer ganz ausgezeichneten Gare befand, so daß durch die gute physikalische Beschaffenheit die Beschleunigung der Nitrifikation im Boden teilweise zu erklären ist. Ob bei der Schaffung der Gare vielleicht das entstehende Natriumsulfat mitgewirkt hat, wurde nicht näher untersucht. Jedenfalls ist diese außerordentlich schnelle Nitrifikation sehr bemerkenswert.

Kapitel II.

Weitere Untersuchungen über Bakterienzahl und Rassen in den verschiedenen Böden.

Die im vorigen Kapitel mitgeteilten Zahlen bestätigen zugleich aber auch die im Anfang mitgeteilte Erfahrung, daß die Zahl der in den verschiedenen Böden vorkommenden Thiosulfatbakterien sehr verschieden ist oder daß man je nach der Art des Bodens auch gewisse Rassen in dieser Bakterienart unterscheiden kann.

Betrachtet man nämlich den in gleicher Zeit — etwa 5 Wochen — erfolgten Umsatz von Nitrat in Erde und Kompost, so erhält man folgende Zahlen:

Material	Nitrat im Anfang	Verbrauchtes Nitrat	Nitratverbrauch in %
Erde	86,6 mg	6,0 mg	6,9 %
Kompost	102,4 „	27,5 „	26,9 %

Es zeigt sich also der beträchtliche Unterschied von 7 Proz. und 27 Proz. im Nitratumsatz. Da der Verbrauch des Thiosulfates nicht genau zu ermitteln ist, wie schon mehrfach erwähnt wurde, und dadurch das Verhältnis des Thiosulfatverbrauches zum Nitratverbrauch vollkommen unbekannt bleibt, so kann man leider nicht eindeutig entscheiden, wieweit bei diesem Unterschied die Zahl der Bakterien oder die verschiedene Umsetzungsfähigkeit der einzelnen Rassen eine Rolle spielt. Die Umsetzungsfähigkeit zeigte in diesen

Versuchen auch sehr bedeutende Unterschiede. Das Thiosulfat war in beiden Fällen fast gänzlich verschwunden; es zeigten sich jedenfalls nur ganz geringe Spuren, die vollkommen vernachlässigt werden können. Nimmt man nun trotz der Mängel der Thiosulfatbestimmungen das Thiosulfat als vollkommen von Bakterien verbraucht an, und gibt man die Nitratzersetzung an, die von 1 g Thiosulfat pro 100 g trockener Erde bewirkt wird, so ergeben sich die folgenden Werte:

Erde	4,9	mg Nitrat-N
Kompost	20,3	„ „

Diese Zahlen sollen nur ganz ungefähr die wirklichen Werte darstellen, weil eben die wahren Umsetzungen des Energiematerials nicht zu ermitteln sind. Sie zeigen aber doch, welche beträchtlichen Schwankungen hier vorkommen in den einzelnen Rassen. Vor allen Dingen ist wichtig, daß, sowohl in der Nährlösung, wie im Boden die gleichen Verhältnisse in der Umsetzungsfähigkeit der einzelnen Rassen auftreten. Und auch die genauen, in Lösung erhaltenen Zahlen ergeben ungefähr die gleichen Werte, denn die im zweiten Teil erwähnten Versuche in Nährlösung hatten ergeben:

mit Erde beimpft	— 7,6	mg Nitrat-N
mit Torf beimpft	— 32,4	„ „

Die Werte stimmen also außerordentlich gut überein mit den für Erde und Kompost ermittelten.

Somit wäre auch die schon im Anfang gebrachte Erfahrung bestätigt, daß man vor allen Dingen zwischen einer Rasse in Erde einerseits und einer Rasse in Kompost, Torf, Buchenwaldboden andererseits unterscheiden muß, daß die Unterschiede zwischen Kompost im Vergleich mit Torf usw. selbst nicht so groß sind.

Allein aber aus diesen im Boden angestellten Versuchen auf Rassen in der Bakterienart zu schließen, würde nicht angehen, weil eben die Ernährungsbedingungen in den Böden viel zu verschieden sind, um genaue Vergleiche ziehen zu können. Die Hauptstütze für diese Annahme sind jedenfalls die Versuche, die mit den Thiosulfatbakterien aus verschiedenen Böden in Nährlösung angestellt wurden und die in Teil 2, Kap. 5 eingehend beschrieben wurden. Hervorgehoben muß aber werden, daß die Versuche im Boden niemals auch nur in der geringsten Weise im Widerspruch stehen mit den früheren Erfahrungen, daß vielmehr die letzten Versuche in ausgezeichneter Weise die Untersuchungen in Nährlösung stützen und ergänzen und somit die Annahme von Rassen innerhalb der autotrophen denitrifizierenden Bakterienart um ein Bedeutendes sicherer stellen und rechtfertigen.

Kapitel III.

Nitratzersetzung bei Änderung des Thiosulfat- und Nitratgehaltes im Boden.

Sodann wurde untersucht, wie sich die Umsetzungen dieser Bakterien gestalten, wenn einmal die zugesetzte Thiosulfatmenge, dann die Nitratmenge und zum Schluß beide Faktoren zusammen gesteigert wurden. Besonders wäre es dann interessant, die Umsetzungen bei verschiedenem Verhältnis von Thiosulfat und Nitrat in den verschiedenen Konzentrationen zu studieren. Diese Absicht konnte aber leider nicht ausgeführt werden, weil die Fehlerquellen in der Bestimmung des verbrauchten Thiosulfates doch

zu große waren. Einmal trat Zersetzung durch die Kohlensäure auf, wie schon mehrfach erwähnt wurde. Wie sollte man diese Zersetzung feststellen, ohne zugleich eine Nitratzersetzung durch Bakterien auf Kosten des Thiosulfates beachten zu müssen! Würde man mit Reinkulturen in steriler Erde arbeiten, so würde kaum eine Zersetzung durch CO_2 eintreten, da hier ja nicht die natürliche CO_2-Bildung vorhanden war. Sodann wurde Thiosulfat vom Erdboden adsorbiert. Und zwar fanden sich für Erdboden folgende Werte:

Zugesetztes Thiosulfat	Wiedergefundenes Thiosulfat
0,5%	0,16%
1,0%	0,23%
2,0%	0,78%
4,0%	1,54%

So blieb einmal die Frage offen, ob die Bakterien von dem adsorbierten Thiosulfat auch etwas verbraucht hatten oder nicht. Daß dieser Einfluß der Adsorption wirklich zu befürchten war, geht daraus hervor, daß man ganz regelmäßig bei Abschluß eines Versuches eine gewisse Menge von Thiosulfat fand, die in allen Versuchen fast gleich war, ganz gleichgültig, ob der Versuch nun vielleicht 5 oder 10 Wochen gegangen war, ob 0,5 Proz. oder 2 Proz. Kaliumnitrat verwendet war. Dieser Wert stieg nur ganz minimal bei steigendem Thiosulfatgehalt. Er blieb allerdings aber immer so klein, daß er 0,02 Proz. Thiosulfat nur in einem einzigen Falle erreichte. Es ist anzunehmen, daß dieser kleine Betrag auf Rechnung des sich lösenden adsorbierten Thiosulfats zu setzen war. So mußte denn auf die Feststellung der genauen Thiosulfatumsetzungen verzichtet werden.

Nun zu der Besprechung der Nitratumsetzungen! Es ließ sich feststellen, daß mit steigendem Thiosulfatgehalt bei gleicher Nitratmenge sich auch die Nitratumsetzungen steigerten (vgl. Tabelle 4).

Nitratstickstoffverbrauch in mg N pro 100 g trockner Erde.

1 %	Thiosulfat	— 5,8	mg	Nitrat-N
2 %	„	— 8,5	„	„
3 %	„	— 10,2	„	„
4 %	„	— 13,2	„	„

Allerdings steigt für die höheren Konzentrationen von Thiosulfat die umgesetzte Nitratmenge nur verhältnismäßig wenig, so daß man annehmen kann, daß sich auch hier die Erfahrung v. Carons[1]) bestätigt, daß bei steigenden Mengen von Energiematerial die Umsetzungen — bezogen auf eine Einheitsmenge von Energiematerial — immer kleiner und ungünstiger werden. v. Caron fand nämlich, daß „die Bakterien für eine gleiche Leistung hinsichtlich der Nitratumsetzung nicht immer dieselbe Menge an Energiematerial verwenden. Sie gehen um so verschwenderischer mit der Kohlenstoffquelle um, je mehr ihnen davon zur Verfügung steht.“ Nimmt man an, daß alles Thiosulfat in diesen Versuchen verbraucht gewesen wäre, so würden sich für 1 g Thiosulfat in 100 g trockener Erde folgende Nitratzersetzungen finden (vgl. Tabelle 4):

1 %	Thiosulfat	5,8	mg	Nitrat-N
2 %	„	4,2	„	„
3 %	„	3,9	„	„
4 %	„	3,3	„	„

Bei gleichbleibendem, 1 proz. Thiosulfatgehalt, aber steigendem Nitratgehalt, findet sich folgender Nitratverbrauch pro 100 g trocknem Boden (vgl. Tabelle 4)

[1]) v. Caron, Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Bakterien. Diss.) Göttingen 1912.

0,5 % KNO_3 . . . . . 5,8 mg Nitrat-N
1,0 % KNO_3 . . . . . 5,0 „ „
2,0 % KNO_3 . . . . . 25,5 „ „

Es zeigt sich also auch hier ein Steigen der Nitratzersetzung mit steigendem Nitratgehalt und gleicher Thiosulfatgabe.

So mußte man denn auch bei steigendem Thiosulfatgehalt und steigendem Nitratgehalt eine Steigerung der Nitratzersetzung erwarten und die war denn auch aus dem Zahlenmaterial zu konstatieren. Es zeigten sich folgende Nitratstickstoffverluste pro 100 g trocknem Boden (vgl. Tabelle 4):

1 % $Na_2S_2O_3$ 0,5 % KNO_3 5,8 mg Nitrat-N
2 % $Na_2S_2O_3$ 1,0 % KNO_3 9,7 „ „
3 % $Na_2S_2O_3$ 2,0 % KNO_3 42,0 „ „

Eigenartig ist es auf jeden Fall, daß bei derartigen Konzentrationen wie 3 Proz. Thiosulfat mit 2 Proz. Nitrat noch ein Wachstum der Bakterien eintritt. Allerdings multiplizieren sich ja die Fehler — sie hatten sich ungefähr vervierfacht — da etwa 80 mg Nitrat-N vorlagen und zu jeder Bestimmung nur 20 mg Nitrat-N benutzt wurden — weil mit Rücksicht auf die große Nitratmenge nicht wie gewöhnlich der ganze Nitratgehalt von 100 g trocknem Boden auf einmal bestimmt werden konnte; aber die zersetzten Nitratmengen sind derartig groß, daß sie vollkommen außerhalb dieser Grenzen liegen. Es entsprechen also die hier gefundenen Verhältnisse vollkommen den Erfahrungen, wie man sie bei anderen Bakterien gemacht hat[1]).

Kapitel IV.

Einfluß des Wassergehaltes auf die Nitratzersetzung.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde nun der Einfluß des Wassergehaltes auf die Nitratumsetzungen der Thiosulfatbakterien untersucht. Hiermit sollte untersucht werden, ob diese denitrifizierenden Bakterien mit ihrem ganz eigenartigen Stoffwechsel dieselben allgemeinen Eigenschaften zeigen, wie sie gewöhnlichen denitrifizierenden Formen, wie z. B. Bacterium fluorescens, zukommen.

Als die ersten Untersuchungen über die Nitratzersetzung der denitrifizierenden Bakterien bekannt wurden, da glaubte man einen Faktor von ungeahnter Bedeutung für die Landwirtschaft gefunden zu haben, welcher der Landwirtschaft ungemessenen pekuniären Schaden zufügen könnte. Die Frage wurde auf das eingehendste ventiliert, und die Meinungen der Forscher variierten in der ausgedehntesten Weise. Die einen stritten der Denitrifikation jegliche Bedeutung für das Verschwinden des Salpeters im Boden ab, die anderen sahen in ihr die allergrößte Gefahr für den so wichtigen Pflanzennährstoff. Einen sehr vollständigen Überblick über diese Streitfragen gibt die Arbeit von v. Caron[2]) aus dem hiesigen Institut. Das Problem wurde endlich gelöst durch eine Arbeit von Koch und Pettit[3]), ebenfalls aus dem hiesigen Institut. In dieser Arbeit wurde auf das genaueste festgestellt, daß der Denitrifikationsprozeß im Boden im allgemeinen ganz anders verläuft als in Nährflüssigkeit. Während in der Nährlösung das Nitrat stets zu frei entweichendem Stickstoff reduziert wird, wird im Erdboden vom normalen Feuch-

[1]) v. Caron, Untersuchungen über die Physiologie denitrifizierender Bakterien. (Diss.) Göttingen.
[2]) v. Caron, Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 33. p. 62.
[3]) Koch u. Pettit, Centralbl. f. Bakt. Abt. II, Bd. 26. p. 335.

tigkeitsgehalt das Nitrat zum allergrößten Teile zu Eiweißstickstoff umgesetzt. Im Erdboden geht der Nitratstickstoff also seiner Hauptmenge nach gar nicht verloren, sondern bleibt der Pflanzenvegetation erhalten. Steigt der Wassergehalt, so tritt auch im Boden eine vollkommene Änderung der Nitratzerstörung ein; dann wird auch im Boden das Nitrat zum größten Teile zu freiem Stickstoff zersetzt, so daß große Stickstoffverluste eintreten. Die Arbeit zeigt, daß also die bisherige Art der Untersuchung der Bakterientätigkeit in Nährlösung für die Beurteilung der Umsetzungen im Boden überhaupt kaum in Frage kommt, daß eben nur Untersuchungen im Boden selbst uns Aufklärung schaffen können über die Umsetzungen der einzelnen Bakterienarten im Boden und über die Wichtigkeit dieser Prozesse für die Landwirtschaft.

Die eben angeführten Beobachtungen waren teils an Rohkulturen, teils auch mit Reinkulturen gemacht. Ganz interessant mußte nun die Beantwortung der Frage sein, ob sich die gleichen Resultate auch bei einer solch empfindlichen und in ihren ganzen Umsetzungen spezifischen Bakterienart ergeben würden, wie bei den vorliegenden Thiosulfatbakterien.

Es wurden also Erdversuche angesetzt, die mit Nitrat und Thiosulfat versetzt waren, bei 18 Proz. und 30—35 Proz. Wasser. Es wurden also zunächst keine Reinkulturen verwendet.

Der erste Versuch, der in dieser Hinsicht angestellt wurde, mißlang etwas, da wegen der Ferien der Wassergehalt zu niedrig wurde. Immerhin ließ sich schon hier ein bedeutender Unterschied in der Nitratzersetzung erkennen:

Wassergehalt in %	Nitratstickstoffverbrauch in mg pro 100 g trocken. Boden	Verlust an Gesamtstickstoff in mg pro 100 g trocknem Boden
18,0	— 11,8 mg	— 13,5 mg
30,0	— 17,7 mg	— 23,3 mg

Viel instruktiver sind die Resultate der nächsten Reihe in Erde, die in ganz gleicher Weise angesetzt wurde (vgl. Tabelle 3):

Wassergehalt in %	Nitratverbrauch in mg pro 100 g trocknem Boden	Gesamtstickstoffverluste in mg pro 100 g trocknem Boden
18,0	— 5,3 mg	— 23,4 mg
35,0	— 73,1 mg	— 80,7 mg

Aufs deutlichste sieht man hier den Unterschied in der Nitratzersetzung und in der Stickstoffentbindung. Allerdings kommt für den Wert für Nitratverbrauch bei 18 Proz. Wasser noch die Überlegung hinzu, daß nach Verbrauch des Thiosulfates die durch die Denitrifikation verdeckte Nitratbildung lebhaft zum Ausdruck kommt, so daß der wirkliche Wert der Nitratzersetzung verschleiert wird. Auf diese Tatsache wurde aber schon am Anfang dieses Kapitels hingewiesen. Von Wichtigkeit ist ja aber vor allen Dingen nur der Unterschied in dem entwichenen Stickstoff, weil ja nur dieser allein die wirklichen Verluste für den Boden anzeigt. Der Rest des umgesetzten Nitratstickstoffes ist ja dem Boden als Eiweiß erhalten geblieben.

Ein gleicher Versuch wurde auch noch für höhere Konzentrationen von Thiosulfat ausgeführt. Zeigten die vorhergehenden Versuche einen Thiosulfatgehalt von 1 Proz., so wurde nun die Erde mit 2 Proz. Thiosulfat versetzt. Als Endergebnis ergab sich nach 13 Wochen:

18 % H_2O: — 10,3 mg Nitrat-N pro 100 g tr. Boden
35 % H_2O: — 67,1 „ „ „ 100 g „ „

Also auch hier in schlagender Weise das gleiche Verhalten!

Ein Reinkulturversuch, der in dieser Hinsicht angesetzt wurde und natürlich die gleichen Resultate ergab, soll hier nicht näher besprochen werden, da am Schluß des Versuches versäumt wurde, nachzuweisen, daß die Kultur wirklich rein geblieben war.

Die in Rohkultur erhaltenen Zahlen zeigen ja auch zur Genüge, daß die denitrifizierenden Thiosulfatbakterien genau wie die gewöhnlichen Denitrifikationsbakterien in äußerst charakteristischer Weise auf die physikalische Beschaffenheit des Bodens reagieren.

Auch die Umsetzungen der Thiosulfatbakterien in Kompost von verschiedenem Wassergehalt zeigen die gleichen Ergebnisse (vgl. Tabelle 3).

Wassergehalt in %	Nitratverbrauch in mg N pro 100 g trockn. Boden	Gesamtstickstoffverbrauch in mg pro 100 g trockn. Boden
23,0	+ 5,2 mg	— 20,0 mg
40,0	— 88,6 „	—
50,0	— 93,9 „	— 125,1 „

Die Versuche wurden nach 14 Wochen abgebrochen. Da der Kompost eine ganz andere Wasserkapazität hat, als gewöhnlicher Ackerboden, so liegt natürlich die Grenze des Wassergehaltes, der Stickstoffentbindung veranlaßt, dementsprechend höher.

Für Buchenwaldboden wurden ebenfalls die gleichen Untersuchungen angestellt.

Es ergaben sich für Buchenwaldboden (Tabelle 3):

64,2 % H_2O: + 46,6 mg Nitrat-N pro 100 g trockn. Boden
110,0 % H_2O: — 181,2 „ „ „ 100 g „ „

Und hier wird die Erfahrung bestätigt, daß bei niedrigem Wassergehalt und Verbrauch des Energiematerials die Denitrifikation durch eine lebhafte Nitratbildung verdeckt wird!

Somit dürfte für die Thiosulfatbakterien auf das nachdrücklichste nachgewiesen sein, daß sie in ganz gleicher Weise wie die gewöhnlichen Denitrifikationsbakterien mit ihren Nitratumsetzungen auf die physikalische Beschaffenheit des Bodens reagieren. Wenn aber also selbst diese ganz spezifischen Denitrifikationsbakterien die gleichen Eigenschaften zeigen wie die heterotrophen, so dürfte damit eine kräftige Stütze für die Ansicht erbracht sein, daß die in der Koch und Pettitschen Arbeit erhaltenen Resultate von allgemeinster Bedeutung für alle Denitrifikationsprozesse in der Natur sind.

Kapitel V.

Nitratzersetzung bei Änderung der Energie-, Nitrat- und Karbonatquellen im Boden.

Zum Schluß dieser Untersuchungen wurden noch einige Versuche angestellt, die zeigen sollten, wie die verschiedenen salpetersauren Salze zur Denitrifikation von den Thiosulfatbakterien benutzt werden können. Leider gingen bei der Nitratbestimmung einige Versuche verloren, so daß nur Bestimmungen von Kaliumnitrat und Ammoniumnitrat vorliegen. Aber hierdurch ergab sich noch eine schöne Bestätigung früher erwähnter Tatsachen. Ammoniumnitrat führt dem Boden doch auch Ammoniakstickstoff zu, so daß neben der Denitrifikation durch Thiosulfatbakterien eine lebhafte Nitrifikation verlaufen muß. Bei Besprechung der Thalauschen Arbeit ganz am Schluß dieser Untersuchung wird auch noch einmal erwähnt werden, daß durch diese

Nitrifikation wohl sicherlich die Denitrifikation vollständig verdeckt werden wird. Und dies Resultat wurde denn auch bei den Schlußnitratbestimmungen gefunden:

Bei Zusatz von

0,5 % KNO_3	— 6,0 mg	Nitrat-N	pro	100 g	trockn.	Boden
0,5 % NH_4NO_3:	+ 8,7 „	„	„	100 g	„	„

Noch eine interessante Tatsache muß hier erwähnt werden. Neben Thiosulfat als Energiematerial, Nitrat als Sauerstoffquelle muß natürlich Karbonat eine Rolle als Kohlenstoffquelle spielen, da schon von Lieske und Nathansohn nachgewiesen war, daß die Umsetzungen dieser Bakterien durch organische Substanz nicht gefördert wird, daß diese Bakterien überhaupt nicht die Fähigkeit haben, zugeführte organische Substanz in ihren Umsetzungen zu verwenden. Somit waren diese Formen auf anorganische Kohlensäure als Kohlenstoffquelle angewiesen. Es wurde versucht, ob durch Zusatz von Natriumbikarbonat zu Erde, die mit Thiosulfat und Nitrat versetzt war, eine Steigerung des Nitratumsatzes zu erzielen war. Und diese trat tatsächlich ein. Die Nitratzersetzung in mg N pro 100 g trocknem Boden zeigt die folgende Zusammenstellung:

ohne $NaHCO_3$:	— 6,0 mg	Nitrat-N	pro	100 g	trockenem	Boden
mit $NaHCO_3$:	— 22,7 „	„	„	100 g	„	„

So zeigt sich deutlich, daß im Boden nicht genügend Karbonat vorhanden ist, um diesen Umsetzungen durch Thiosulfat ein Optimum zu schaffen.

Ein Zusatz von Karbonat würde sicherlich das gleiche Resultat ergeben haben, da ja im zweiten Teile dieser Arbeit an Kulturen in Nährlösung gezeigt war, daß die Bakterien als Kohlenstoffquelle gleich gut Bikarbonat wie auch Karbonat verwenden können. Mancher wird nun auf den ersten Blick annehmen, daß diese Steigerung der Umsetzungen durch Zusatz von Karbonat ja die vorhin im dritten Teil, Kapitel II aufgeführten Unterschiede in den einzelnen Rassen erklären würde. Dem steht aber entgegen, daß die Rassenunterschiede festgestellt worden sind in Nährlösungen mit ganz gleichem Nährstoffgehalt, wo also Unterschiede, die durch Nährstoffmangel bedingt worden wären, vollkommen ausgeschaltet waren.

Lieske erwähnt in seiner Arbeit, daß die Thiosulfatbakterien wohl alle Oxydationsstufen des Schwefels zu Sulfat oxydieren und zu ihren Umsetzungen als Energiequelle verwenden. Es wurde versucht, dies auch an Erdversuchen nachzuweisen. Als Energiequellen wurden benutzt Na_2S, Na_2SO_3 und Schwefel. Die Umsetzungen waren folgende (Tabelle 5):

0,5 % S:	— 2,1 mg	Nitrat-N	pro	100 g	trockenem	Boden
0,5 % Na_2S :	— 3,9 „	„	„	100 g	„	„
0,5 % Na_2SO_3:	— 3,9 „	„	„	100 g	„	„
0,5 % $Na_2S_2O_3$:	— 6,0 „	„	„	100 g	„	„

In allen Versuchen ist eine Abnahme des Nitrats zu konstatieren. Beim Schwefel ist sie allerdings so gering, daß man wohl keinen positiven Schluß daraus ziehen darf. Dies ist ja auch sehr erklärlich, da der Schwefel nur sehr wenig löslich ist. Immerhin macht es der Versuch sehr wahrscheinlich, daß auch der Schwefel wirklich eine Nitratzersetzung, die allerdings sehr klein ist, im Boden herbeiführen kann. Die anderen Versuche bestätigen aber zur Genüge die Lieskeschen Annahmen. Wenn Thiosulfat die größte Nitratzersetzung ergeben hat, so beruht dies darauf, daß dieses Salz sehr leicht zersetzlich ist und sehr leicht in Sulfat überzuführen ist.

Ganz interessant war es nun zu berechnen, welche Energiemengen überhaupt frei werden können bei der Oxydation der verschiedenen vorhin genannten Schwefelverbindungen zu Sulfat, und mit diesen die gefundenen Nitratumsetzungen zu vergleichen. Berechnet man diese Werte auf entstehendes gasförmiges SO_3, so findet man für ein Molekül folgende Werte:

H_2S	147,27 kg Kal.
S	91,90 „ „
SO_2	22,64 „ „
$Na_2S_2O_3$	18,50 „ „
für 1 Mol. S	9,25 „ „

Der hohe Wert von H_2S erklärt sich durch die gleichzeitig freiwerdende Verbrennungswärme des Wasserstoffes.

Es zeigt sich also, daß die Bakterienumsetzungen nicht im Einklang stehen mit der Energie, die bei den Umsetzungen frei werden kann. Diese Differenz wird sicherlich dadurch erklärt, daß eben diese verschiedenen Stoffe verschieden schwer angreifbar bzw. löslich sind, so daß sie den Bakterien teilweise nicht in der ausreichenden Menge zur Verfügung stehen. Schon Lieske hatte ja bei Untersuchungen in Nährlösung gefunden, daß die Umsetzungen mit Schwefel als Energiematerial mindestens zwei- bis dreimal so lange dauern als die Umsetzungen mit Thiosulfat. Welche anderen Faktoren hierbei sonst noch mitspielen können, läßt sich aus dieser kleinen Tabelle nicht entscheiden.

Hier sollte nun noch versucht werden, ob nicht andere oxydationsfähige Materialien, wie Mangan- und Ferrosalze, als Energiequellen für Thiosulfatbakterien dienen können, weil hier doch Formen vorlagen, die an anorganische Energiequellen angepaßt waren. Die Versuche wurden nun so angesetzt, daß man neben Thiosulfat und Nitrat dem Boden noch 0,2 Proz. Mangansulfat oder 0,1 Proz. Ferrosulfat zusetzte. Wirkten diese Substanzen wirklich als Energiequellen, dann mußte sich eine Steigerung des Nitratumsatzes durch den Zusatz dieser Salze ergeben:

Erde	Nitratverbrauch in mg N pro 100 g trockener Erde
+ Thiosulfat	— 5,7 mg
+ Thiosulfat + 0,2% $MnSO_4$	— 5,6 mg
+ Thiosulfat + 0,1% $FeSO_4$	— 2,0 mg

Wie aber Nitratbestimmungen nach fünf Wochen ergaben, hatte Mangansulfat gar keinen Einfluß ausgeübt, Eisensulfat hatte das Bakterienwachstum scheinbar geschädigt, es war nur sehr wenig Nitrat umgesetzt. So erschienen diese Thiosulfatbakterien als ganz spezifische, nur dem Schwefel in ihren Umsetzungen angepaßte Formen.

IV.

Kapitel 1.

Die Versuchsergebnisse der Thalauschen Arbeit.

Nachdem der größte Teil dieser Untersuchungen schon beendet war, fand sich eine Arbeit, die — bei anderer Deutung der Versuchsresultate — die hier gebrachten Resultate ausgezeichnet bestätigte und zugleich zeigte, daß diesen hier behandelten Bakterienformen in gewissen Fällen auch ein

praktisches Interesse zukommt. Es ist die Arbeit von Walter Thalau[1]): „Die Einwirkung von im Boden befindlichen Sulfiten, von Thiosulfat und Schwefel auf das Wachstum von Pflanzen."

Angeregt durch die bekannte Schädigung, die freie schweflige Säure aus Rauch- und Röstgasen auf die Pflanzenvegetation ausübt, und durch die schädigende Wirkung von schwefliger Säure in Pflanzennährlösungen untersuchte der Verf. die Einwirkung verschiedener Sulfite auf die Pflanzen in Vegetationsversuchen in Erde, Hochmoortorf und Sandboden. Zu den Versuchen wurden glasierte Tongefäße mit eingelegten Siebböden benutzt, wie sie in agrikulturchemischen Instituten oft gebraucht werden; deren Vegetationsoberfläche betrug 386 qcm. Die Gefäße faßten durchschnittlich 8,8 kg an Lehmboden, 8,5 kg an Sandboden, 1,1 kg an Torfboden.

Nach einer Grunddüngung von 4 g Thomasmehl und 2 g Kalisalz für jedes Gefäß wurde jedem Versuch noch eine Stickstoffdüngung von 0,3 g N gegeben, teils als Ammoniumsulfat allein, teils als Ammoniumsulfit allein, teils endlich als Ammoniumsulfat und Sulfit. Daneben wurde noch als Stickstoffdüngung Burkheisersalz gegeben, welches 20,8 Proz. N, 37,64 Proz. SO_2 und 14,60 Proz. SO_3 enthält. Dieses Salz hat seinen Namen von dem Ingenieur Burkheiser. Es wird bei der Koksbereitung gewonnen, indem der Schwefel der Kohle in SO_2 verwandelt und dieses zur Neutralisation von NH_3 verwendet wird.

Die genaue Versuchsanordnung war folgendermaßen:

1. Grunddüngung 4 g Thomasmehl, 2 g Kalisalz (40%),
2. „ + 0,3 g N (0,745 g $(NH_4)_2SO_4$ + 0,789 g $(NH_4)_2SO_3$),
3. „ + 0,3 g N (0,070 g $(NH_4)_2SO_4$ + 1,578 g $(NH_4)_2SO_3$),
4. „ + 0,3 g N (1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + — $(NH_4)_2SO_3$),
5. „ + 0,15 g N (0,705 g $(NH_4)_2SO_4$ + — $(NH_4)_2SO_3$),
6. „ + 0,3 g N (1,44 g Burkheiser Salz),
7. „ + 0,15 g N (0,72 g Burkheiser Salz),
8. „ + 0,57 g N (3,156 g $(NH_4)_2SO_3$),
9. „ + 0,3 g N (1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 1,1 g $CaSO_3$),
10. „ + 0,3 g N (1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 2,2 g $CaSO_3$),
11. „ + 0,3 g N (1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 3,3 g $CaSO_3$).

Jede Versuchsreihe führte fünf Parallelgefäße. Zunächst wurden im Jahre 1911 diese 11 Versuchsreihen ausgeführt, im Jahre 1912 wurden die Ergebnisse vom vorhergehenden Jahre nachgeprüft. Als Versuchspflanzen wurde für Lehmboden, Torf und Sand Hafer benutzt; für Lehmboden außerdem noch Senf.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen seien hier wörtlich nach den Angaben des Verf. wiedergegeben:

Kurze Betrachtung über die Ergebnisse der Kulturversuche im Jahre 1911.

a) Lehmboden: Es ist weder bei Senf- noch bei Haferkulturen in irgendeinem Falle eine Schädigung im Wachstum oder im Ernteertrag der Trockensubstanz durch Ammoniumsulfit oder Burkheiser Salz zu konstatieren . . . . Die Differenz im Wirkungswert von Sulfit- und Sulfatstickstoff ist gering und schwankt zugunsten des einen oder des anderen Düngemittels ein wenig. Calciumsulfit hat keinen schädigenden Einfluß ausgeübt.

b) Torfboden: Calciumsulfit hat den Ernteertrag vermindert . . . . . Es ergibt sich dann für Sulfitstickstoff der Wirkungswert 0,67, der also ge-

[1]) Thalau, W., Landw. Vers. Stat. Bd. 82. p. 161.

rade den dritten Teil von dem des Sulfatstickstoffs ausmacht. Die Ursache dafür, weshalb die Wirkung des Sulfitstickstoffes so bedeutend hinter der des Sulfatstickstoffes zurückbleibt, dürfte dadurch zu erklären sein, daß im sauren Sphagnum-Torf die die Pflanzen schädigende schweflige Säure längere Zeit unverändert bleibt und unvollkommen oxydiert wird . . .

c) Sandboden: . . . . . Die Wirkungsfaktoren von Sulfat- und Sulfitstickstoff sind annähernd gleich . . . . . Durch Calciumsulfit sind bei der Haferernte keine nennenswerten Unterschiede im Wachstum und Ertrage zu verzeichnen. . . . .

Ergebnisse der Haferernte 1912.

a) Lehmboden: . . . . Sulfat- und Sulfitstickstoff halten sich im Wirkungswert ungefähr das Gleichgewicht. Die Stickstoffausnutzung ist ungefähr ebensogroß wie im Vorjahre und unter Mittel geblieben.

b) Torfboden: . . . . Die Gaben von 0,15 g N pro Gefäß sind bei dem Sand, wie auch bei den Torfbodenkulturen weggelassen worden, da es ja in erster Linie nur darauf ankam, eine etwaige schädigende Wirkung der schwefligen Säure bei höheren Gaben von Ammoniumsulfit zu konstatieren. . . . . Hiernach berechnet sich der Wirkungswert des Sulfatstickstoffes auf 1,35 gegenüber 0,86 für Sulfitstickstoff, übersteigt also wiederum letzteren im Torfboden beträchtlich (um das 1½-fache, im Vorjahre um das 3-fache!). Für die Tatsache, daß die schwächste Gabe von schwefliger Säure einen geringeren Ertrag als die stärkere gab, liegt keine Erklärung vor.

c) Sandboden: Ammoniumsulfit hat hier auch in keinem Falle, selbst nicht bei den stärksten Gaben, schädlich gewirkt.

Zusammenfassung.

Will man aus den während der beiden Jahre 1911 und 1912 erhaltenen Resultaten einen Vergleich bezüglich der Wirkung von Sulfiten zu der Wirkung entsprechender Mengen von Ammoniumsulfat ziehen, so macht ganz besonders die Beschaffenheit des Bodens sich bemerkbar. Außer einem guten Lehmboden waren zwei Böden von extremer Beschaffenheit verwendet, nämlich reiner Hochmoortorf (Torfstreu) und reiner Quarzsand.

a) Lehmboden: Sowohl bei Senf- wie bei Haferkulturen hat sich Ammoniumsulfit dem Ammoniumsulfat vollständig gleichwertig erwiesen; durch Calciumsulfit und Natriumthiosulfat hat sich in keinem Falle eine Schädigung ergeben.

b) Torfboden: Auch im Versuchsjahre 1912 ist der Wirkungswert von Ammoniumsulfitstickstoff bedeutend geringer als der von Sulfatstickstoff. Die organischen Bestandteile des Hochmoortorfes hinderten die Oxydation der schwefligen Säure, die nun längere Zeit auf die Pflanze einwirkte, und zwar bei Gegenwart von Humussäure zum Teil im freien Zustand. Andererseits ist zu beachten, daß in beiden Jahren mit steigenden Gaben von Sulfit auch höhere Erträge erzielt wurden, und sich die Ertragskurven gut an das Gesetz vom Minimum anlegen. . . . Calciumsulfit hat entschieden ungünstig auf den Ertrag eingewirkt.

c) Sandboden: . . . Im allgemeinen hat der Stickstoff des Ammoniumsulfits im Sandboden fast ebensogut wie derjenige des Ammoniumsulfats gewirkt. . . . Calciumsulfit hat bei den Haferkulturen keinen nennenswerten Ertragsrückgang gegenüber der Düngung mit reinem Ammoniumsulfat bewirkt. . . .

Vergleicht man die Wirkungswerte von Ammoniumsulfat- und Ammoniumsulfitstickstoff während beider Jahre, so ergibt sich:

Tabelle 1.

	Lehm		Torf		Sand	
	Sulfat	Sulfit	Sulfat	Sulfit	Sulfat	Sulfit
Senf 1911	0,8	0,72	—	—	—	—
Senf 1912	0,76	0,67	—	—	—	—
Hafer 1911	0,76	0,8	1,94	0,67	1,59	1,3
Hafer 1912	0,98	1,01	1,35	0,86	1,87	1,57

Setzt man den Wirkungswert von Ammoniumsulfatstickstoff hierbei gleich 100, so erhält man:

Tabelle 2.

	Lehm		Torf		Sand	
	Sulfat	Sulfit	Sulfat	Sulfit	Sulfat	Sulfit
Senf 1911	100	90	—	—	—	—
Senf 1912	100	88	—	—	—	—
Hafer 1911	100	105	100	34,5	100	82
Hafer 1912	100	103	100	64,0	100	83
Im Durchschnitt beider Jahre						
Senf	100	89	—	—	—	—
Hafer.	100	104	100	43,6	100	82,5

Kapitel II.

Widerlegung der Thalauschen Untersuchungen und Schlüsse aus Tatsachen seiner eigenen Arbeit.

Was ist nun zu den Gründen, die Thalau zur Erklärung der aufgetretenen Unterschiede zwischen den verschiedenen Bodenformen ausführt, zu sagen?

Nach meiner Meinung widerspricht sich Thalau selbst in seinen Ausführungen. Er erklärt die Schädigung, die auf Pflanzenwachstum im Hochmoor durch Sulfite auftritt, dadurch, daß „die organischen Bestandteile des Hochmoortorfes die Oxydation der schwefligen Säure hinderten, so daß die schweflige Säure nun längere Zeit auf die Pflanzen einwirkte, und zwar bei Gegenwart der Humussäure zum Teil im freien Zustand".

Dabei findet Thalau, daß sich die schweflige Säure an der Luft und im Boden sehr leicht oxydiert zu Sulfat, so daß sie dann ihre giftige Wirkung vollkommen verlieren muß. Aus einer Tabelle, die Thalau über diese Oxydationsversuche gibt, geht nun hervor, daß sich die Sulfite im Torf ungefähr gleich schnell wie in Erde oxydieren, dagegen aber schneller als im Sandboden. Die Unterschiede sind allerdings nur sehr winzig, die einzelnen Bestimmungen sind außerdem sehr verschieden, so daß man aus der Tabelle ebensogut erwarten konnte, daß im Sandboden eine Schädigung durch Sulfite auftreten müßte, nicht aber im Torfboden.

Zur Klärung der Frage sei hier der Thalausche Oxydationsversuch nach seiner eigenen Darstellung wiedergegeben. Die Oxydationsversuche wurden so angestellt, daß die verschiedenen Bodenarten mit Ammoniumsulfit in den Mengen, wie sie im Vegetationsversuch benutzt wurden, ver-

setzt wurden. Von diesen Proben wurden dann fortlaufend SO_2-Bestimmungen gemacht. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigt die folgende Tabelle:

Zahl der Tage	Lehmboden % SO_2	Torfboden % SO_2	Sandboden % SO_2
0	5,07	7,47	6,71
	3,46	7,64	6,02
	4,87		
1	1,82	1,93	2,4
	2,34	1,9	
2	0,77	1,64	2,24
3	0,81	1,52	0,93
6	0,66	0,53	0,61
	0,68	0,94	1,1
9	0,98	0,99	0,74
	0,44	0,63	0,54
12	0,633	0,74	0,84

Ein eigenartiges Schwanken der Werte fällt sofort jedem auf, z. B.

Lehmboden 0 Tag: 5,07 bis 3,46
Lehmboden 9 Tag: 0,98 bis 0,44 (50%).

Wie der Verf. selbst angibt, kommen beim Mischen von Sulfiten mit Erde Adsorptionserscheinungen in Frage. Ehe nicht der Einfluß dieses Faktors eingehend geprüft ist, kann aus dieser Tabelle nach meiner Meinung nicht der geringste Schluß gezogen werden.

Außerdem kommt noch eine Tatsache in Frage. Wie aus der Thalauschen Oxydationstabelle hervorgeht, sind vom sechsten Tage doch auf jeden Fall die SO_2-Mengen im Lehmboden, wie im Torfboden vollkommen gleich (dabei hatte Torf scheinbar im Anfang einen höheren Prozentgehalt an SO_2, da ich mir sonst die Verschiedenheit bei 0 Tagen im Lehmboden und Torf nicht erklären kann). Dabei gibt Thalau an, daß der Aufgang der Samen im Jahre 1912 zwölf Tage nach der Aussaat erfolgte, wo doch schon vom sechsten Tage die Verhältnisse gleich waren. Eine Verzögerung im Aufgehen wird nur bei ganz hohen Ammoniumsulfitkonzentrationen beobachtet; es macht sich dann ein Unterschied von $1\frac{1}{2}$ Tagen bemerkbar. Dabei sollte man glauben, daß diese Verzögerung nur im Torf stattfinden würde; aber dabei gibt der Verf. selbst an, daß die Verzögerung in allen drei Bodenarten erfolgt! Wie steht diese Tatsache im Einklang mit den Ausführungen und Erklärungen des Verfassers? Dabei stellt sich noch heraus, daß bei diesen hohen Konzentrationen von Sulfit später nicht einmal eine Schädigung des Erntegewichtes gefunden wird, sondern im Gegenteil eine Förderung, während Versuche mit kleinen Sulfitmengen gerade beim Erntegewicht sich geschädigt zeigen, während im Anfang nicht die geringste Verzögerung oder Schwächung auftritt! Von dieser letzten Tatsache erwähnt der Verf. allerdings selbst, daß er sie sich nicht erklären kann, und daß sie keineswegs in Übereinstimmung mit seinen Erklärungen steht.

Und so ließen sich noch weitere Einwendungen, allerdings weniger maßgebend, finden. Nach all diesen Betrachtungen erscheinen die Erklärungsversuche von Thalau nicht recht wahrscheinlich.

Kapitel III.

Erklärung der Thalauschen Versuchsergebnisse durch die Resultate der vorliegenden Arbeit.

Wie würden sich nun die von Thalau gebrachten Tatsachen erklären lassen, wenn man die Wirksamkeit von Thiosulfatbakterien in Betracht zieht und alle Unterschiede im Erntegewicht erklärt durch den in verschiedenen Mengen zersetzten Nitratstickstoff, der ja aus dem Ammoniakstickstoff entstehen muß?

Lieske hatte allerdings gefunden, daß in Nährlösung Natriumsulfit als Energiematerial für Thiosulfatbakterien nicht dienen kann. Es erfolgt gar kein Wachstum der Bakterien. Diese Tatsache würde gut mit der Erfahrung von Thalau übereinstimmen, daß Sulfite in Nährlösungen für Pflanzen äußerst schädlich wirken und sehr bald die Pflanzen zum Absterben bringen. Und doch trat im Lehmboden durch Zusatz von Sulfiten keine Schädigung des Pflanzenwachstums auf! Ähnlich verhalten sich auch die Thiosulfatbakterien. Schon Lieske gab an, daß diese Bakterien an ihren Standorten wohl jede niedrigere Oxydationsstufe des Schwefels zu Sulfat oxydieren können. Und eigene Versuche bestätigten diese Annahme.

Schon ehe die Thalausche Arbeit mir bekannt war, war ein Erdversuch angesetzt, der zeigen sollte, daß auch Natriumsulfit als Energiematerial für Denitrifikation dienen kann. Als nach 5 Wochen der Versuch abgebrochen wurde, fand sich eine Nitratabnahme von 3,9 mg, eine Zahl, die nur wenig geringer ist als die Nitratzersetzung durch Thiosulfat im Boden.

Nachdem wirklich bestätigt war, daß Natriumsulfit ebenfalls als Energiematerial für Denitrifikation im Boden dienen kann, konnten die Thalauschen Versuchsergebnisse weiter in der angegebenen Fragestellung durchgearbeitet werden.

Einer der wirksamsten Faktoren auf die pflanzliche Vegetation ist der Stickstoffgehalt des Bodens. Und zwar war es lange Zeit hindurch eine Streitfrage, ob der für die Pflanze brauchbare Stickstoff im natürlichen Boden als Nitratstickstoff oder auch als Ammoniakstickstoff aufgenommen werden kann.

Neuere Versuche[1]) lassen allerdings erkennen, „daß die Pflanze im natürlichen Boden auf Nitrat als alleinige Stickstoffquelle im wesentlichen angewiesen ist und deshalb die Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen in unseren Fruchtfolgen gleichbedeutend ist mit der Frage nach der Entstehung und den weiteren Schicksalen des Nitrats im Boden."

Als Beweis für diese Anschauung wird folgender Versuch angegeben: „Wenn man dem Boden Zellulose als Energiematerial für salpeterzersetzende Bakterien zufügt, so wandeln letztere das im Boden fortwährend neu entstehende Nitrat in Bakterieneiweiß um, und solange dieser Prozeß anhält, bleiben die in solchen Boden gesäten Pflanzen ganz klein und im Jugendstadium stehen. Sobald aber die Zellulose aufgezehrt ist, wird das neu entstehende Nitrat nicht mehr umgewandelt, bleibt erhalten, und von nun an wachsen auch die Pflanzen."

Die genauen Zahlenbelege sind folgende:

---

[1]) Koch, Pflanzennährstoffe d. Bodens unter dem Einfluß der Bakterien. (Zeitschr. „Kali". 1912. u. Koch, Ergebnisse zehnjähriger Feldversuche. (Journ. f. Landw. 1913. p. 254).

	Mittelernte pro Gefäß in Gramm ohne Zellulose	mit Zellulose
1908 Buchweizen	22,1	3,0
1909 Rüben	17,7	4,4
1910 Senf, Buchweizen	12,9	14,6
1911 Buchweizen, Grünkohl . .	27,5	27,4

Diese Versuche zeigen aufs deutlichste, daß das im Boden vorhandene Nitrat von hervorragender Bedeutung für das Pflanzenwachstum ist.

In den Thalauschen Versuchen ist den Pflanzen als Stickstoffquelle nur Ammoniak gegeben. Obwohl Kossowitsch[1]), Gerlach und Vogel[2]), Krüger[3]) und andere nachgewiesen haben, daß die Pflanzen Ammoniak als Stickstoffnahrung verwenden können, und Krüger[3]) gezeigt hat, daß die in den Thalauschen Vegetationsversuchen verwendeten Pflanzen — Senf und Hafer — „sich den beiden Stickstoffquellen — Ammoniak und Salpetersäure — gegenüber gleich verhalten, so daß sie sich für ihre Ernährung gleichwertig erweisen, . . .“ so möchte ich doch die Unterschiede im Erntegewicht, wie sie Thalau bei seinen Vegetationsversuchen feststellen konnte, auf den in diesen Versuchen aus dem Ammoniak gebildeten Nitratstickstoff zurückführen. Voraussetzung ist bei dieser Erklärung der Versuche, daß wirklich im benutzten Torf eine Nitratbildung vorhanden ist, wie sie sich in dem im II. Teil dieser Arbeit erwähnten Versuch zeigte. Jedenfalls handelte es sich bei dem von Thalau benutzten Torf um ausgetrocknete, gelagerte und ziemlich zersetzte Torfstreu, die wesentlich andere physikalische Bedingungen zeigt als frischer Hochmoortorf, so daß man in dem von Thalau benutzten Torf sicherlich eine Nitratbildung erwarten kann!

Durch das zugesetzte Sulfit wird in den Vegetationsversuchen von Thalau auch Energiematerial für denitrifizierende Thiosulfatbakterien gegeben, wie oben gezeigt ist. Im Lehmboden und Sandboden ist die hierdurch bewirkte Denitrifikation äußerst gering, wie aus den im III. Teil angeführten Zahlen über die Umsetzungen dieser Bakterien im Boden hervorgeht. Die Bakterien können im Lehmboden also nicht schädigend auf das Pflanzenwachstum einwirken. Ammoniumsulfit und Ammoniumsulfat müssen im Erdboden also das gleiche günstige Resultat auf das Erntegewicht hervorrufen. Dies entspricht vollkommen den Thalauschen Versuchsergebnissen:

	Düngung	Ertrag
1.	0,745 g $(NH_4)_2SO_4$ + 0,789 g $(NH_4)_2SO_3$ = 0,3 g N	161,18 g
2.	0,070 g $(NH_4)_2SO_4$ + 1,570 g $(NH_4)_2SO_3$ = 0,3 g N	173,3 g
3.	1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ = 0,3 g N	165,7 g

Eine Schädigung ist durch Sulfitzusatz wirklich nicht zu beobachten. Vielmehr tritt bei Erhöhung des Sulfitzusatzes, indem gleichzeitig auch die Stickstoffgabe erhöht wird, eine Erhöhung des Ernteertrages ein, indem eben durch das vermehrte Ammoniak die Nitratbildung gesteigert wird:

	Düngung	Ertrag
1.	1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ = 0,3 g N	165,7 g
2.	3,156 g $(NH_4)_2SO_3$ = 0,67 g N	223,7 g

[1]) Kossowitsch, Journ. f. exper. Landw. p. 637.

[2]) Gerlach u. Vogel, Centralbl. f. Bakt. II. Bd. 14. p. 124. Weitere Angaben: Löhnis, Handb. d. landw. Bakt. 1910. p. 602.

[3]) Krüger, Landw. Jahrb. Bd. 34. p. 761.

Ähnlich werden sich auch die Bakterienumsetzungen im Sandboden gestalten.

Ganz anders sind dagegen die Versuchsergebnisse im Torf. Sulfite üben auf jeden Fall eine Schädigung aus:

1911

Düngung		Ertrag
1. 0,705 g $(NH_4)_2SO_4$	0,15 g N	24,00 g
2. 1,41 g $(NH_4)_2SO_4$	0,3 g N	29,82 g
3. 1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 1,1 g $CaSO_3$	0,3 g N	24,56 g
4. 1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 2,2 g $CaSO_3$	0,3 g N	24,12 g
5. 1,41 g $(NH_4)_2SO_4$ + 3,3 g $CaSO_3$	0,3 g N	23,60 g
6. 3,156 g $(NH_4)_2SO_3$	0,57 g N	25,48 g
7. 0,72 g Burkheiser Salz	0,15 g N	19,56 g

1912

1. 1,41 g $(NH_4)_2SO_4$	0,3 g N	144,8 g
2. 1,846 g $(NH_4)_2SO_3$	0,325 g N	137,1 g
3. 3,692 g $(NH_4)_2SO_3$	0,65 g N	150,6 g
4. 5,538 g $(NH_4)_2SO_3$	0,975 g N	167,1 g

Aus den Versuchen geht deutlich hervor, daß bei gleicher Ammoniumsulfatdüngung durch steigenden Gehalt an Calciumsulfit eine steigende Schädigung hervorgerufen wird (1911, Versuch 3, 4, 5); ferner, daß bei gleichem Stickstoffgehalt durch Zusatz von Ammoniumsulfat und Ammoniumsulfit eine Schädigung hervorgerufen wird (1911, Versuch 1 und 7; 1912, 1 und 2), daß hingegen bei steigenden Ammoniumsulfitmengen und daher steigenden Stickstoffmengen die Schädigung allmählich aufhört und in eine lebhafte Förderung des Erntegewichtes übergeht (Versuch 1911, 7; 1912, 2, 3, 4).

Wie sind nun diese Tatsachen durch die Bakterienumsetzungen zu erklären?

Im Anfang war gezeigt, daß die Nitratumsetzungen der Thiosulfatbakterien im Kompost, Torf und Schlamm ungleich größer sind als im Erdboden. Zunächst ist die Zahl der Bakterien eine viel größere, und dann sind die dort vorkommenden Rassen bedeutend virulenter als die im Erdboden. Die Nitratumsetzungen nehmen im Torf, Kompost usw. eine Größe an, daß sie wirklich im allgemeinen Stoffwechsel zur Geltung kommen, vor allem, wenn ihnen noch in derartiger Menge Energiematerial zugeführt wird. So muß man sich die Schädigung so erklären, daß das aus dem Ammoniakstickstoff gebildete Nitrat in beträchtlicher Menge von den Thiosulfatbakterien zersetzt wird. Diese Zersetzung steigt mit steigenden Calciumsulfitmengen; daher fällt das Erntegewicht mit steigendem Calciumsulfitgehalt (1911, Versuch 3, 4. 5).

Die Tatsache, daß bei steigendem Ammoniumsulfitzusatz keine Schädigung des Erntegewichtes eintritt, ist so zu erklären, daß durch die steigenden Ammoniakgaben die Bildung der Nitratmengen bedeutend stärker gefördert wird als die Zersetzung des Nitrats, daß also trotz der weiter bestehenden, sicherlich auch geförderten Zersetzung des Nitrates trotzdem eine Schädigung des Erntegewichtes nicht zu beobachten ist, so daß man annehmen muß, daß zu jeder Zeit genügend Nitrat vorhanden ist, um eine stattliche Entwicklung der Pflanzen zu bewirken.

Ich glaube, auf diese Weise sind alle Versuchsergebnisse der Thalauschen Arbeit in einfacher und einleuchtender Weise erklärt. So ergeben diese

Tatsachen auch wieder eine ausgezeichnete Stütze und Bestätigung aller in meiner Arbeit gegebenen Resultate; vor allem ist die Bestätigung des Vorhandenseins der verschiedenen virulenten Rassen von größter Wichtigkeit und auch sicherlich großem Interesse.

Wichtig ist nun auch noch die Frage, ob die zugesetzten Mengen von Energiematerial wirklich diese Umsetzungen bewirken können. Da ist denn die Tatsache von Wichtigkeit, daß in den Töpfen die Substanzen einer nur verhältnismäßig kleinen Erdmenge zugesetzt wurden, so daß die Nährstoffe in einer Konzentration vorhanden waren, die diesen Thiosulfatbakterien eine lebhafte Nitratumsetzung gestatten. Lehmboden und Sandboden kommen hier ja nicht so in Frage, weil in ihnen diese Bakterien einen derartigen Einfluß nicht ausüben. Es wäre also nur der Torf zu behandeln.

Der Verf. gibt bei seinen Oxydationsversuchen selbst an, daß 1 g Ammoniumsulfat auf 200 g Lehmboden resp. Sandboden oder 25 g Torf kommt und daß diese Menge den bei den Vegetationsversuchen benutzten Mengen gleich ist.

Das würde fast genau den Mengen entsprechen, die in meiner Arbeit meistens benutzt wurden und mit denen diese außerordentlich beträchtlichen Umsetzungen erzielt wurden. Somit dürfen auch von dieser Seite aus der von mir gebrachten Erklärung der Thalauschen Versuchsresultate keine Schwierigkeiten begegnen. Welchen Einfluß 100—150 mg N auf das Wachstum und das Ernteresultat haben, geht zur Genüge aus den Thalauschen Tabellen hervor. Und diese Mengen sind durch Zersetzung des Nitrats durch Thiosulfatbakterien bei den vorliegenden Energiemengen wirklich zu erreichen. Diese Zahlen geben natürlich nur an, was bei genügendem Nitratvorrat erreicht werden kann. Es genügt ja aber schon, daß die Thiosulfatbakterien in der Zeit, wo das meiste Nitrat von der Pflanze verbraucht wird, die Menge des vorhandenen Nitrats etwas herabzusetzen, um die Ernteerträge schon zu schädigen.

Also ein Mangel an Energiematerial kommt wirklich bei diesen Untersuchungen nicht in Frage.

So zeigt auch diese Arbeit wieder aufs deutlichste, daß es vielfach nicht genügt, allein vom agrikulturchemischen Standpunkte solche Fragen zu behandeln, daß es vielmehr von großer Bedeutung ist, auch die Umsetzungen dieser Stoffe im Boden zu verfolgen, die von Bakterien ausgelöst werden können. In einer erst ganz kürzlich erschienenen Arbeit behandelt J. Vogel[1]) die Einwirkung von Schwefel auf die bakteriellen Leistungen des Bodens. In dieser Arbeit wird der Schwefel aber immer nur in sehr geringen Mengen zugesetzt, so daß eine Verwendung als Energiematerial nicht in Frage kommt. Nur könnte die in der Einleitung von Vogel gebrachte Tatsache von Interesse sein, daß auch Schwefelzusatz zu Torf eine Schädigung des Erntegewichtes bewirkt. Dieses Versuchsergebnis bestätigt also sehr schön das Thalausche Resultat.

V.

Zum Schlusse dieser Arbeit sei noch eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse gegeben:

1. Die von Lieske im Schlamm des Botanischen Gartens zu Leipzig aufgefundene autotrophe anaërobe, deni-

[1]) Vogel, Die Einwirkung von Schwefel auf die bakteriellen Leistungen des Bodens. (Centralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 40. p. 60.)

trifizierende Thiosulfatbakterie konnte auch für die verschiedensten Schlammarten der Göttinger und Hamelner Umgebung festgestellt werden. Dadurch ist für diese Bakterienart eine ausgedehnte Verbreitung sichergestellt.

2. Dieselbe Bakterie konnte auch für Göttinger Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und für Hochmoortorf aus Ostfriesland nachgewiesen werden. Somit kommt dieser Form eine ganz ungeahnte weite Verbreitung zu und ihre Umsetzungen sind bei diesem allgemeinen Vorkommen von Bedeutung für den Haushalt der Natur.

3. Die Zahl dieser Bakterien ist in verschiedenen Tiefen von Ackererde und Torf ganz gleich.

4. Die Zahl dieser Bakterien ist in Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf sehr verschieden, und zwar steigt der Gehalt an diesen Bakterien mit steigendem Kohlenstoffgehalt des Bodens. Diese Tatsache wurde sowohl an den Umsetzungen dieser Bakterien in Nährlösung, wie auch in Böden festgestellt.

5. Neben der verschiedenen Menge vorhandener Bakterien lassen sich in den verschiedenen Böden gewisse Rassen dieser Bakterienform unterscheiden, die in ihrer Virulenz große Verschiedenheiten zeigen. Und zwar kann man die Formen von Kompost, Buchenboden und Torf zu einer größeren Gruppe von Rassen zusammenfassen und sie der Rasse aus Ackererde gegenüberstellen. Die Unterschiede in der Umsetzungsfähigkeit dieser Rassen verhalten sich wie 4 : 1.

6. Bei steigendem Thiosulfatgehalt zeigt sich eine steigende Nitratzersetzung sowohl in Nährlösung, wie auch in Boden. Ebenfalls steigt die Nitratzersetzung bei steigendem Nitratgehalt.

7. Das Nitrat als Sauerstoffquelle konnte nicht durch andere sauerstoffhaltige Substanzen wie Sulfat, Methylenblau usw. ersetzt werden.

8. Ebenfalls konnte das Thiosulfat als Energiematerial nicht durch andere, schwefelfreie Substanzen ersetzt werden, wohl aber durch schwefelhaltige. Als Kohlenstoffquellen wirkten Karbonat und Bikarbonat ganz gleich.

9. Durch Zusatz von Thiosulfat zu Böden kann eine lebhafte Denitrifikation hervorgerufen werden, die allerdings nicht ganz so stark ist wie bei Zusatz von organischem Energiematerial.

10. Bei der Nitratzersetzung durch Thiosulfatbakterien im Boden zeigten die Bakterien das gleiche Verhalten gegenüber der physikalischen Beschaffenheit des Bodens, wie es von Koch und Pettit für die heterotrophen Denitrifikationsbakterien nachgewiesen war.

11. Durch Zusatz von Bikarbonat zum Boden konnte eine lebhafte Steigerung der Nitratzersetzung im Boden bewirkt werden.

Tabelle 1.

Nitratumsetzungen in ungedüngter Ackererde.

No.	Wassergehalt %	Nitratgehalt in mg N pro 100 g trockenem Boden			Thiosulfatgehalt in g pro 100 g trockenem Boden			Dauer der Versuche
		Anfang	Ende	±	Anfang	Ende	Verbrauch	
1	18,44	1,084	1,307	+ 0,223	—	—	—	5 Wochen
2	18,44	86,87	86,8	—	—	—	—	„
3	18,44	86,87	81,1	— 5,77	1,226	0,002	— 1,224	„
4	16,68	—	2,43	—	—	—	—	6 Wochen
5	16,68	86,53	82,5	— 4,03	0,603	—	—	„
6	16,68	86,53	74,75	— 11,78	0,603	0,009	— 0,594	8 Wochen
7	18,—	85,86	80,6	— 5,26	1,186	0,010	— 1,176	10 Wochen
8	18,—	85,86	88,76	+ 2,9	0,593	—	— 0,593	14 Wochen
9	18,—	85,86	87,16	+ 1,3	1,186	0,010	— 1,176	„

Tabelle 2.

Nitratumsetzungen in Ackererde, Komposterde, Buchenwaldboden und Torf.

No.	Wassergehalt %	Nitratgehalt in mg N pro 100 g trockenem Boden			Thiosulfat in g pro 100 g trockenem Boden	Dauer der Versuche	Bodenart
		Anfang	Ende	±			
1	18,44	86,87	81,1	— 5,77	1,226	5 Wochen	Erde
2	16,68	86,53	82,5	— 4,03	0,603	6 Wochen	Erde
3	18,—	85,86	87,16	+ 1,3	1,186	14 Wochen	Erde
4	26,36	7,34	13,45	+ 6,11	—	5 Wochen	Kompost
5	26,36	102,44	81,4	— 21,04	1,357	5 Wochen	Kompost
6	22,8	99,63	104,8	+ 5,2	1,295	14 Wochen	Kompost
7	64,2	212,94	259,5	+ 46,56	2,795	14 Wochen	Buchenwaldboden
8	110,—	212,94	31,79	— 181,15	2,795	14 Wochen	Buchenwaldboden
9	90,48	330,—	114,—	— 216,—	4,675	14 Wochen	Torf

Tabelle 3.

Einfluß des Wassergehaltes auf die Nitratumsetzungen und die Stickstoffentbindung in Ackererde, Komposterde und Buchenwaldboden.

No.	Bodenart	Wassergehalt %	Thiosulfatgehalt in g pro 100 g trockn. Boden	Nitratgehalt in mg N pro 100 g trockenem Boden			Gesamtstickstoffgehalt in mg N pro 100 g trockenem Boden			Dauer der Versuche
				Anfang	Ende	±	Anfang	Ende	±	
1	Erde	18,00	1,186	85,86	80,6	— 5,26	216,12	192,7	— 23,42	10 Wochen
2	Erde	35,00	1,186	85,86	12,75	— 73,11	216,12	135,4	— 80,72	„
3	Kompost	22,8	1,295	99,63	104,8	+ 5,2	360,5	338,5	— 22,0	14 Wochen
4	Kompost	50,00	1,295	99,63	5,73	— 93,9	360,5	235,4	— 125,1	„
5	Buchenwaldboden	64,2	2,795	212,94	259,5	+ 46,56	—	—	—	„
6	Buchenwaldboden	110,00	2,795	212,94	31,79	— 181,15	—	—	—	„
7	Erde	18,00	2,372	85,86	76,55	— 10,31	—	—	—	„
8	Erde	35,00	2,372	85,86	18,80	— 67,06	—	—	—	„

Tabelle 4.

Nitratumsetzungen bei steigendem Thiosulfat- und Nitratgehalt in Ackererde.

No.	Wassergehalt %	Nitratstickstoff in mg N pro 100 g trockenem Boden			Thiosulfatgehalt in g pro 100 g trockenem Boden			Dauer der Versuche
		Anfang	Ende	±	Anfang	Ende	Verbrauch	
1	18,44	1,084	1,307	+ 0,223	—	—	—	5 Wochen
2	18,44	86,87	86,8	—	—	—	—	„
3	18,44	86,87	81,1	— 5,77	1,226	0,002	— 1,224	„
4	18,44	86,87	78,4	— 8,47	2,452	0,005	— 2,447	„
5	18,44	86,87	76,7	— 10,17	3,678	0,018	— 3,60	„
6	18,44	86,87	73,7	— 13,17	4,904	0,020	— 4,884	„
7	18,44	172,58	167,6	— 5,0	1,226	—	— 1,226	„
8	18,44	344,08	318,5	— 25,5	1,226	—	— 1,226	„
9	18,44	172,58	162,9	— 9,7	2,452	0,007	— 2,445	„
10	18,44	172,58	161,6	— 11,0	3,678	0,012	— 3,665	„
11	18,44	344,08	314,5	— 29,5	2,452	0,003	— 2,449	„
12	18,44	344,08	302,00	— 42,0	3,678	0,012	— 3,666	„
13	18,—	85,86	88,76	+ 2,9	0,593	—	— 0,593	14 Wochen
14	18,—	85,86	87,16	+ 1,3	1,186	0,010	— 1,176	„
15	18,—	85,86	76,55	— 10,31	2,372	0,019	— 2,353	„
16	35,—.	85,86	18,80	— 67,06	2,372	0,012	— 2,360	„

Tabelle 5.

Wirkung verschiedener Schwefelquellen auf die Nitratumsetzung in Ackererde.

No.	Wassergehalt %	Schwefelquelle	Nitratgehalt in mg N pro 100 g trockener Boden			Gehalt an schwefelhaltiger Substanz	Dauer der Versuche
			Anfang	Ende	±		
1	18,44	ohne Zusatz	1,084	1,307	+ 0,223	—	5 Wochen
2	18,44	Thiosulfat	86,87	81,1	— 5,77	1 %	„
3	18,44	Na_2SO_3	86,87	83,2	— 3,67	0,5 %	„
4	18,44	Na_2S	86,87	83,2	— 3,67	0,5 %	„
5	18,44	S	86,87	85,00	— 1,87	0,5 %	„
6	18,44	Thiosulfat + 0,2 % $NaHCO_3$	86,87	64,15	— 22,72	1 %	„

12. Die Ergebnisse der Thalauschen Arbeit: „Die Einwirkung von im Boden befindlichen Sulfiten, von Thiosulfat und Schwefel auf das Wachstum von Pflanzen“ können in ausgezeichneter Weise durch die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate erklärt werden.

Diese Arbeit wurde im Kgl. landwirtschaftlich-bakteriologischen Institut der Universität Göttingen ausgeführt. Es sei mir gestattet, Herrn Prof. Dr. A. Koch an dieser Stelle für die Anregung zu dieser Arbeit und die freundliche Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Lebenslauf.

Am 21. Juli 1892 wurde ich in Hameln a. d. Weser als preußischer Staatsangehöriger geboren. Ich bin evangelisch-lutherischer Konfession. Zunächst besuchte ich in meiner Vaterstadt die Mittelschule, dann die neugegründete Realschule, an der ich Ostern 1907 die Berechtigung zum einjährig-freiwilligen Dienst erwarb. Sodann war ich noch 3 Jahre auf der Oberrealschule an der Lutherkirche in Hannover, wo ich Ostern 1910 mit dem Zeugnis der Reife entlassen wurde. Ich studierte auf den Universitäten Jena (3 S.), Kiel (1 S.) und vom S.-S. 1912 ab in Göttingen. Vom 1. Juli 1913 ab bin ich Assistent am Kgl. landw.-bakteriol. Institut der Universität Göttingen.

Meine akademischen Lehrer waren:

In Jena die Herren: Detmer, Diehl, Hase, Haußner, Knorr, Linck, Plate, Stahl, Stoy und Winkelmann.

In Kiel die Herren: Brandt, Deußen, Feist, Harries, Mumm, Reibisch, Reinke, Wüst.

In Göttingen die Herren: Baumann, Berthold, Bousset, Ehlers, Husserl, Koch, Kötz, Mecking, Mügge, Müller, Peter, Pompecky, Runge, Titius, Wallach, Zsigmondy.

Allen meinen Lehrern bin ich zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Fürstlich priv. Hofbuchdruckerei (F. Mitzlaff)
Rudolstadt.